

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Ingeniería Química**



**TESIS DOCTORAL**

**Producción de monoglicérido de ibuprofeno catalizada por  
lipasas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Marianela Ravelo Velásquez**

Directores

**Félix García-Ochoa Soria  
Miguel Ladero Galán**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Ingeniería Química**



**PRODUCCIÓN DE MONOGLICÉRIDO DE  
IBUPROFENO CATALIZADA POR LIPASAS**

**Memoria**

Que para optar al Grado de Doctor en el Programa de Doctorado  
en Ingeniería Química presenta:

**Marianela Ravelo Velásquez**

**Madrid, 2016**



El Profesor Dr. Félix GARCÍA-OCHOA SORIA, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid, y el Dr. MIGUEL LADERO GALÁN, Profesor Titular de la misma Universidad, afirman haber dirigido el presente trabajo en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Los Directores,

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dr. Miguel Ladero Galán



*A mis padres*

*A la niña*

*A mí*



*En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Félix García-Ochoa Soria la oportunidad que me ofreció para pertenecer a su grupo de investigación, así como también su buena disposición y buenos consejos.*

*Un especial agradecimiento quiero dar al Dr. Miguel Ladero por su buena disposición, paciencia en todo momento tanto a nivel de trabajo experimental como en el aprendizaje obtenido a lo largo de estos años.*

*A la Dra. Elena Fuente por su buena disposición, paciencia, su entrega y guía científica en el empleo de técnicas de análisis de FBRM y DLS, así como la confianza depositada en mi persona, a la hora de la utilización de los equipos de su grupo de investigación.*

*A mamá y papá que a pesar de la distancia, siempre me apoyan en los malos y buenos momentos de mi carrera profesional y en mi vida personal. A ti papá, que a pesar de que físicamente no estas a mi lado, tu alma me protege y guía en cada momento, y tus recuerdos me motivan a seguir luchando cada día. Mamá y papá los quiero mucho.*

*Mis más sincero agradecimiento a mi hermana Marisela (la niña) y a su esposo Ricardo, por permitirme quedarme durante mi estancia de estudio en su casa y por el apoyo ofrecido en todo momento. Te quiero mucho niña. Así también, les doy las gracias a mis amigos Liz y Edgar, por estar siempre pendiente de mis estudios y de mi persona.*

*Al Prof. Juan María Becerra, gracias a sus buenos consejos me motivaron a emprender este doctorado. Además, a la Sra. Arelis y al Sr. Paolo por brindarme su ayuda en el momento en que más lo necesité.*

*También, quiero dar las gracias a Carmen, Lorena, Isabel, Dani y Juanjo por su compañía y amistad durante mi estancia en el laboratorio. A los chicos, Alberto y Matheusz otros integrantes de mi grupo de investigación, por su buena disposición y su tiempo en la explicación del uso del viscosímetro. De igual manera, a mis compañeros de laboratorio Jesús, las dos Lauras, a pesar de que no compartí mucho con ellos, pude contar con ellos cuando necesite su ayuda.*

*A Imma y José, los técnicos del laboratorio, por su ayuda en el momento de realizar una experimentación y a Nieves por su charla amena y sus ricas torrijas.*

*Por último, agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por la financiación a cargo de los proyecto CTQ-2010-15460 y CTQ2011-12725-E.*



---

## ÍNDICE

---

## ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1.- LA GLICERINA</b>	2
1.1.1.- Obtención de la glicerina	4
1.1.2.- Evolución de la producción de glicerina	7
1.1.3.- Aprovechamiento de la glicerina	11
1.1.4.- Esterificación de glicerina	13
<b>1.2.- ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEOS</b>	15
1.2.1.- Mercado de los AINEs	18
1.2.2.- Profármacos de AINEs	21
1.2.3.- Ácidos arilpropiónicos	22
<i>Ibuprofeno</i>	23
<b>1.3.- ENZIMAS LIPASAS</b>	25
1.3.1.- Estructura y mecanismo de acción	27
1.3.2.- Aplicaciones de lipasas	29
1.3.3.- Lipasas en medio orgánico	31
1.3.4.- Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	33
<b>1.4.- OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO</b>	36
<b>1.5.- REFERENCIAS CITADAS</b>	38
<b>2.-MATERIALES Y MÉTODOS</b>	45
<b>2.1.- EQUIPOS</b>	45
2.1.1.- Equipo para la medida de solubilidades	45
2.1.2.- Equipo para el estudio de la reacción de esterificación	46
2.1.3.- Equipo para la medida de viscosidad	46
2.1.4.- Equipo de Análisis	47
<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</i>	47
<i>Cromatografía líquida- Espectrómetro de Masas</i>	48
<i>Distribución de tamaños de gota</i>	49
<i>Superficie específica y tamaño de poros para el soporte de la enzima inmovilizada</i>	51
<i>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</i>	51
2.1.5.- Equipos auxiliares	52
<b>2.2.- MATERIALES</b>	53
2.2.1.- Enzimas Lipasas	53
2.2.2.- Obtención de ibuprofeno por precipitación	56
<b>2.3.- MÉTODOS</b>	57
2.3.1.- Determinación de solubilidad del ibuprofeno	57
2.3.2.- Desarrollo de un experimento de esterificación	58
2.3.3.- Determinación de la viscosidad de mezcla	58
2.3.4.- Caracterización de la suspensión-emulsión	59
2.3.5.- Caracterización del soporte de la enzima	61
<i>Medida de la superficie específica BET</i>	61
<i>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</i>	61
<b>2.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS</b>	61
2.4.1.- Análisis de las muestras líquidas	61

<i>Análisis de solubilidad por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	61
<i>Análisis de la mezcla de reacción por Cromatografía Líquida de Alta Resolución</i>	62
<i>Análisis del producto de reacción por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas</i>	66
<i>Análisis de la medida de distribución del tamaño de gota</i>	67
2.4.2.- Caracterización del soporte de la enzima inmovilizada	69
<i>Superficie específica</i>	69
<i>Distribución de tamaño de poro</i>	70
<b>2.5.- MÉTODOS MATEMÁTICOS</b>	71
<b>2.6.- REFERENCIAS CITADAS</b>	74
<b>3.-ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO CATALIZADA por LA ENZIMA CALB-L: PROCESO sin COSOLVENTE</b>	75
<b>3.1.- EXPERIMENTOS PREVIOS</b>	76
3.1.1.-Solubilidad del ibuprofeno en glicerina	76
3.1.2.- Efecto de la concentración de enzima	81
3.1.3.- Efecto de la velocidad de agitación	82
3.1.4.- Estudio de efectos de inhibición y desactivación	84
<i>Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno</i>	84
<i>Efecto de la concentración de agua</i>	86
<b>3.2.- DETERMINACIÓN del MODELO CINÉTICO</b>	87
3.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos	87
3.2.2.- Formulación de modelo cinéticos	93
3.2.3.- Selección del modelo cinético	97
<b>3.3.- REFERENCIAS CITADAS</b>	105
<b>4.-ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO CATALIZADA POR LA ENZIMA CALB-L: PROCESO con COSOLVENTE</b>	107
<b>4.1.- EXPERIMENTOS PREVIOS</b>	108
4.1.1.- Selección del cosolvente: Solubilidad de ibuprofeno en tolueno	108
4.1.2.- Efecto de la concentración de enzima	112
4.1.3.- Efecto de la velocidad de agitación	114
4.1.4.- Relación glicerina-tolueno	114
4.1.5.- Estudio de efectos de inhibición y desactivación	116
<i>Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno</i>	116
<i>Efecto de la concentración de agua</i>	119
<b>4.2.- DETERMINACIÓN del MODELO CINÉTICO</b>	121
4.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos	121
4.2.2.- Formulación de modelo cinéticos	127
4.2.3.- Selección del modelo cinético	130
<b>4.3.- REFERENCIAS CITADAS</b>	137
<b>5.-ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO CATALIZADA por NOVOZYM 435: PROCESO sin COSOLVENTE</b>	139
<b>5.1.- ESTUDIO del SISTEMA ANHIDRO</b>	141
<b>5.1.1.- Experimentos previos</b>	141
5.1.1.1.- Efecto de la concentración de enzima	141

5.1.1.2.- Estudio de la transferencia de materia	142
<i>Transferencia de Materia Externa</i>	142
<i>Transferencia de Materia Interna</i>	147
5.1.1.3.- Estudio de efectos de inhibición y desactivación	150
<i>Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno</i>	150
<i>Efecto de la concentración de agua</i>	152
<b>5.1.2.- Determinación del modelo cinético</b>	153
5.1.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos	154
5.1.2.2.- Formulación de modelo cinéticos	160
5.1.2.3.- Selección del modelo cinético	162
<b>5.2.- ESTUDIO del SISTEMA con ADICIÓN de AGUA</b>	168
<b>5.2.1.- Experimentos previos</b>	168
5.2.1.1.- Estudio de la transferencia de materia	168
<i>Transferencia de Materia Externa</i>	168
<i>Transferencia de Materia Interna</i>	171
5.2.1.2.- Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno	173
<b>5.2.2.- Determinación del modelo cinético</b>	174
5.2.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos	174
5.2.2.2.- Formulación de modelo cinéticos	180
5.2.2.3.- Selección del modelo cinético	181
<b>5.3.- REFERENCIAS CITADAS</b>	187
<b>6.-ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO UTILIZANDO la ENZIMA INMOVILIZADA NOVOZYM 435: PROCESO con COSOLVENTE</b>	190
<b>6.1.- ESTUDIO del SISTEMA ANHIDRO</b>	192
<b>6.1.1.- Experimentos previos</b>	192
6.1.1.1.- Efecto de la concentración de enzima	193
6.1.1.2.- Estudio de la relación glicerina-tolueno	194
6.1.1.3.- Estudio de la transferencia de materia	195
<i>Transferencia de Materia Externa</i>	195
<i>Transferencia de Materia Interna</i>	197
6.1.1.3.- Estudio de efectos de inhibición y desactivación	200
<i>Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno</i>	200
<i>Efecto de la concentración de agua</i>	202
<b>6.1.2.- Determinación del modelo cinético</b>	204
6.1.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos	204
6.1.2.2.- Formulación de modelo cinéticos	209
6.1.2.3.- Selección del modelo cinético	211
<b>6.2.- ESTUDIO DEL SISTEMA con ADICIÓN de AGUA</b>	215
<b>6.2.1.- Experimentos previos</b>	215
6.2.1.1.- Estudio de la transferencia de materia	215
<i>Transferencia de Materia Externa</i>	215
<i>Transferencia de Materia Interna</i>	218
6.2.1.2.- Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno	220
<b>6.2.2.- Determinación del modelo cinético</b>	221
6.2.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos	221

6.2.2.2.- Formulación de modelo cinéticos	227
6.2.2.3.- Selección del modelo cinético	228
<b>6.3.- REFERENCIAS CITADAS</b>	<b>235</b>
<b>7.- RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	<b>237</b>
7.1.- RESUMEN	237
7.2.- CONCLUSIONES	252
7.3.- SUMMARY and CONCLUSIONS	261
<b>8.- NOMENCLATURA</b>	<b>274</b>

---

*Capítulo 1*  
**INTRODUCCIÓN**

---



## **1.- INTRODUCCIÓN**

Durante los últimos años, la Biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente, sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos de alto valor añadido, en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica, principalmente. Los procesos industriales catalizados por enzimas son cada día más numerosos, ya que las enzimas presentan grandes ventajas sobre catalizadores convencionales, siendo las más comunes: la especificidad por sustrato, una alta actividad catalítica y su elevada selectividad, además trabajan en condiciones suaves de temperatura y presión. Las enzimas hidrolasas son los biocatalizadores más usados en la síntesis orgánica y en procesos industriales (Gonzalo, 2003), porque estas enzimas catalizan la hidrólisis selectiva de enlaces tipo C-O, C-N y P-O. Además, presentan una gran versatilidad catalítica, debido a que pueden adoptar diferentes conformaciones; por tanto, su centro activo se puede acomodar a una amplia variedad de sustratos. Dentro de este grupo, las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que presentan un elevado potencial sintético, porque son capaces de catalizar diferentes tipos de reacciones de síntesis, entre otras: esterificación, transesterificación, interesterificación, acidólisis (Contesini y col., 2006; Reis y col., 2009). Debido a que las enzimas lipasas tienen elevada enantioselectividad y regioespecificidad (Laszlo y col., 2009), estas propiedades las han convertido en una de las enzimas con mayor uso en biotransformaciones.

Por otro lado, el problema existente en la actualidad por el agotamiento y escasez de las fuentes de energía convencional han llevado a los países desarrollados a establecer normas para encontrar soluciones a esta situación. Así, la Unión Europea (UE) con la Directiva 2003/30/CE relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el sector transporte, establece el objetivo de alcanzar para el 2010 un 5,75% de toda la energía utilizada en el sector transporte debe proceder de biocarburantes. Con el fin de prolongar la acción y establecer nuevos objetivos, se promulga la Directiva 2009/28/CE que marca las obligaciones y objetivos para el año 2020, entre los cuales se incluye el requerimiento de que el 10% de la energía consumida en la UE proceda de fuentes renovables. Por esta razón, los biocarburantes han sido una alternativa para luchar contra la insuficiencia y la dependencia energética. En concreto, en los últimos años, la producción de biodiesel se ha incrementado y, con ello, la producción de la glicerina, por ser un subproducto de la síntesis del biodiesel.



Como consecuencia, el precio de la glicerina se ha reducido durante los últimos años; así, los mercados tradicionales de la glicerina (industria cosmética, farmacéutica y alimentaria) no constituyen una demanda suficiente para frenar esta caída. Por esta razón, se han buscado nuevos usos de la glicerina ya sea para uso directo o como intermedio de síntesis o *building block* para obtener otros productos químicos. Actualmente, existen múltiples aplicaciones para la glicerina debido a sus propiedades físicas y químicas. En condiciones normales, es un compuesto muy estable y compatible con otras sustancias químicas, además de no presentar impacto negativo sobre el medio ambiente.

Entre las reacciones de síntesis, la esterificación de la glicerina es una de las vías más utilizadas para su transformación. Por tanto, los esteres de glicerina, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, obtenidos mediante la esterificación de glicerina con ácidos carboxílicos, entre sus aplicaciones, son usados como aditivos alimentarios (Brewster, 1987), disolventes (Ogliaruso y col., 2010), emulsionantes (Pagliaro y col., 2008a), antioxidantes (Batovska y col., 2005), entre otras. La esterificación puede llevarse a cabo térmicamente o usando catalizadores homogéneos o heterogéneos, convencionales o enzimáticos. Dentro de este marco, este trabajo se centra en el estudio de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno (antiinflamatorio no esteroideo, AINE) utilizando lipasas como catalizadores de la reacción, en concreto, la lipasa B de *Candida antarctica* en su forma libre e inmovilizada, para obtener monoglicéridos de ibuprofeno, producto con aplicaciones interesantes en la industria farmacéutica. En este contexto, los ésteres de AINE (profármacos) han surgido como una alternativa para minimizar el efecto adverso de úlceras gastrointestinales causado por el uso crónico por vía oral. En la actualidad, los profármacos han sido usados como suspensiones, emulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones (Zaghloul y col., 2013); por ejemplo, gel de dexibuprofeno (Bergman y col., 2012), derivados transdérmicos de ketoprofeno (Hartwig y col., 2009).

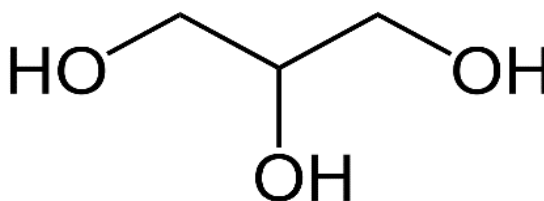
## 1.1.- LA GLICERINA

Este polialcohol está presente de manera natural en las membranas celulares de animales y vegetales formando parte de los fosfolípidos y triglicéridos (grasas y aceites) que las componen. En 1741, tras un estudio exhaustivo de la naturaleza de las grasas, Claude Joseph Geoffroy descubrió la glicerina, aunque es Carl Wilhelm Scheele a quien

se le atribuye su descubrimiento en 1779, porque aisló dicho producto tras calentar una mezcla de óxido de plomo con aceite de oliva.

La glicerina (1,2,3-propanotriol) es un líquido altamente viscoso, incoloro e inodoro con un ligero sabor dulce. Generalmente, al nombrarlo, suele usarse indistintamente los términos “glicerina” y “glicerol”, pero es importante diferenciar entre estos dos términos, glicerina se refiere al producto con un alto grado de pureza, mientras que glicerol es el producto que tiene ciertas impurezas en su composición normalmente proveniente de la producción de biodiesel o de jabón.

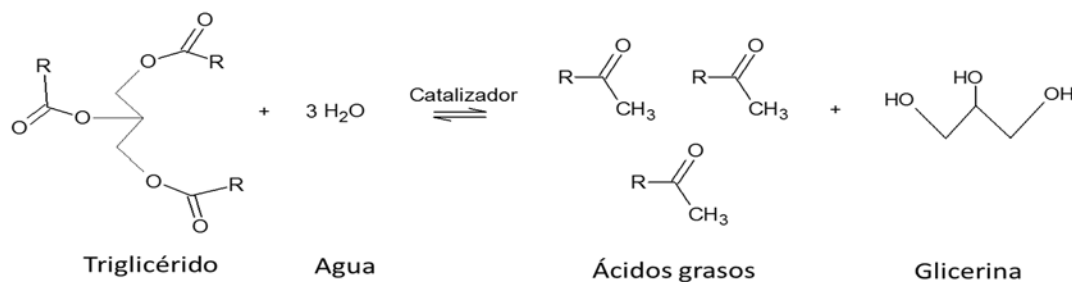
La molécula de glicerina cuenta con tres grupos hidroxilo que le confieren un comportamiento hidrófilo (Figura 1.1), responsables de la solubilidad en agua, metanol, etanol, isómeros del propanol, butanol y pentanol, siendo su solubilidad menor en dioxano, dietil éter y acetona, entre otros, pero es insoluble en compuestos apolares como los hidrocarburos (Pagliaro y col., 2010). La molécula es muy reactiva en la mayoría de las reacciones típicas de alcoholes. Los dos grupos hidroxilos primarios terminales son ligeramente más reactivos que el grupo hidroxilo secundario. Presenta propiedades higroscópica, a temperatura ambiente absorbe rápidamente agua, se puede oxidar con bastante facilidad, los átomos de carbono terminales a grupos aldehídos o carboxilo y el átomo de carbono central puede oxidarse a grupos carbonilo. Además, es un producto estable bajo condiciones de almacenamiento normales, compatible con muchos otros materiales químicos, no irritante, con una variedad de usos y sin efectos medioambientales negativos conocidos. En la Tabla 1.1 se muestran las propiedades fisicoquímicas más importante de la glicerina.



**Figura 1.1.** Estructura de la glicerina



de triglicéridos con 61 g de agua, se producen 95.7 g de ácido graso y 10.4 g de glicerol (Gunstone, 2009).



**Figura 1.3.** Hidrólisis de triglicéridos para producir ácidos grasos y glicerina

Además, la glicerina puede ser obtenida de fuentes diferentes a las grasas y aceites, a partir del propileno se produce glicerina sintética. Existen dos procesos: en el primero se trata el propileno con cloro para obtener cloruro de alilo, que reacciona con una solución de hipoclorito para dar diclorhidrina que reacciona con una base fuerte para dar epiclorhidrina; a partir de ella, se obtiene el glicerol por hidrólisis alcalina. El segundo proceso consiste en oxidar el propileno para formar acroleína que se reduce a alcohol alílico; este compuesto puede hidroxilarse con peróxido de hidrógeno en solución acuosa para obtener glicerol directamente, o tratarse con hipoclorito sódico para obtener glicerol-monoclorohidrina que, mediante hidrólisis alcalina, se convierte en glicerina. En la Figura 1.4 se muestra la ruta de obtención de la glicerina sintética a partir del propileno.

En este proceso, así como por saponificación, hidrólisis y fermentación de azúcares, la cantidad de glicerina obtenida es pequeña. Sin embargo, esta situación ha cambiado en los últimos años, debido al crecimiento del uso de fuentes de energía renovables, los biocombustibles, en específico el biodiesel. La glicerina es un subproducto de la manufactura del biodiesel, donde aproximadamente se producen 11 kg de glicerina por cada 100 kg de biodiesel. En la Figura 1.5 se muestra la reacción de transesterificación (alcoholisis) para la producción de biodiesel y glicerina. En ella, un triglicérido (aceite vegetal, grasa vegetal o animal) reacciona con un alcohol en presencia de un catalizador para producir alquilésteres de ácidos grasos y glicerol. En cuanto al alcohol, el más usado es el metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), aunque por ejemplo en Brasil emplean el etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), porque proviene de la fermentación de azúcares de su industria del bioetanol.

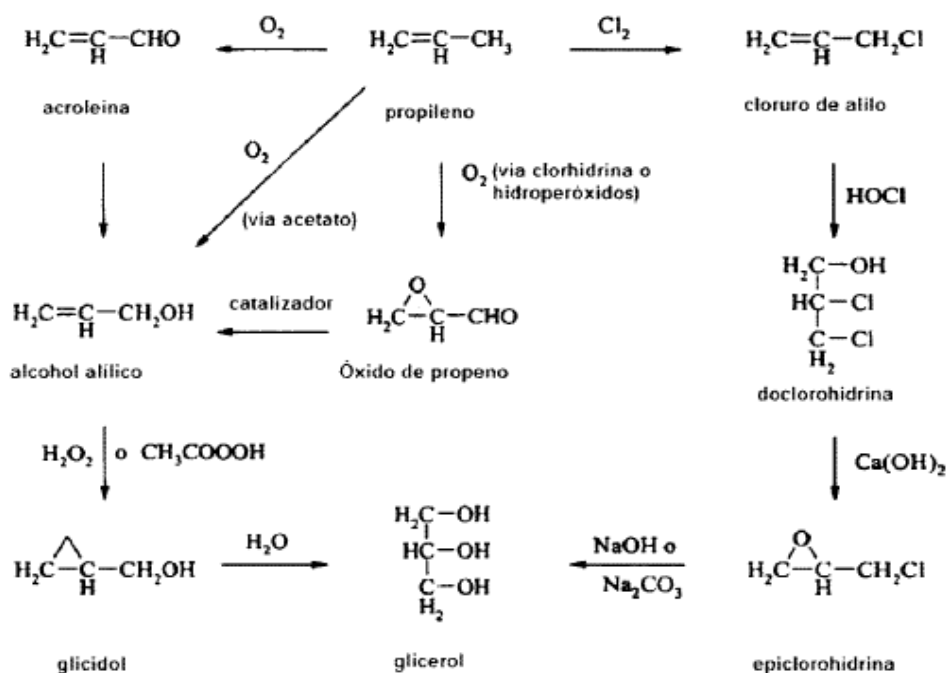


Figura 1.4. Ruta para síntesis de glicerina a partir de propileno

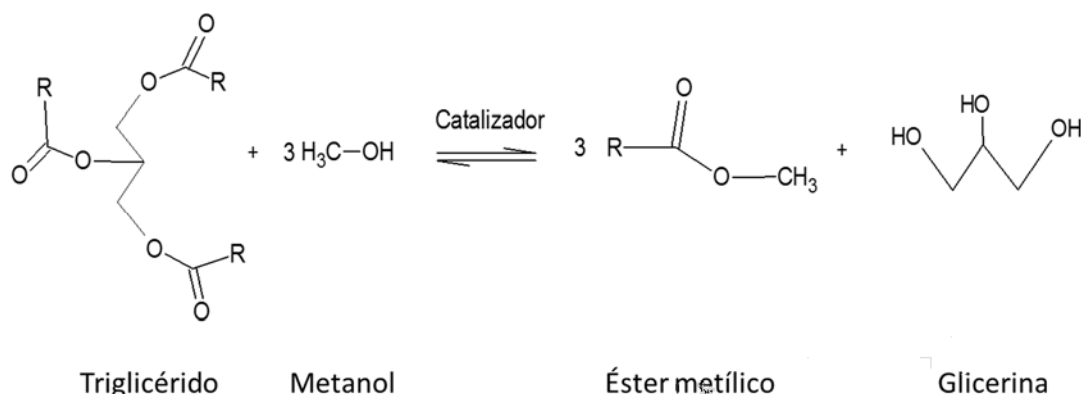


Figura 1.5. Transesterificación de triglicéridos para producir biodiesel y glicerina

La glicerina obtenida del proceso de biodiesel contiene impurezas tales como: metanol, agua, sales inorgánicas (catalizador), ácidos grasos, metil-éter y variedad de materia orgánica, dependiendo del proceso de obtención del biodiesel (Zhou y col., 2008). Por tanto, requiere de un proceso de purificación, el cual consiste en la eliminación de sales (jabón), separación del metanol, ajuste de pH por eliminación de ácidos grasos, etc. De esta manera, la separación de las aguas glicerinosas del proceso del biodiesel es relativamente simple; estas aguas se pueden centrifugar, filtrar o decantar por gravedad una vez que la reacción ha finalizado. Ambas posibilidades son suficientes para lograr una buena separación y obtener un glicerol aproximadamente con un 80% de pureza. Este glicerol crudo es apto para aplicaciones tradicionales en alimentación animal o como fuente de carbono en bioprocesos.

En aplicaciones alimentarias, cosméticas, farmacéuticas y síntesis químicas se requiere de una mayor calidad de glicerina. Por tanto, se requieren de otros métodos de purificación, siendo los más usados destilación, adsorción e intercambio iónico, entre otros. En función del grado de purificación se pueden alcanzar distintas calidades de glicerina, existen tres grados de clasificación de la glicerina refinada: el grado técnico (> 90 % pureza) usado en la síntesis química de productos, el grado USP (> 99,5 % de pureza) y en productos alimentarios y farmacéuticos, y el grado FCC (Food chemicals codex) usado en alimentos (Quispe y col., 2013). En la Tabla 1.2 se presenta las calidades de la glicerina obtenidas a partir de la producción de biodiesel.

**Tabla 1.2.** Composición de las distintas calidades de glicerina (Ayoub y col., 2012)

<b>Característica</b>	<b>Glicerina cruda</b>	<b>Glicerina purificada</b>	<b>Glicerina refinada</b>
Contenido en Glicerol (% masa)	60-80	99.1-99.8	99.2-99.8
Contenido de Agua (% masa)	1.50-6.50	0.11-0.80	0.14-0.29
Acidez (pH)	0.70-1.30	0.10-0.16	0.04-0.07
Cenizas (% masa)	1.50-2.50	0.054	< 0.002
Contenido de Sales (jabón)	3.00-5.00	0.10-0.16	0.04-0.07

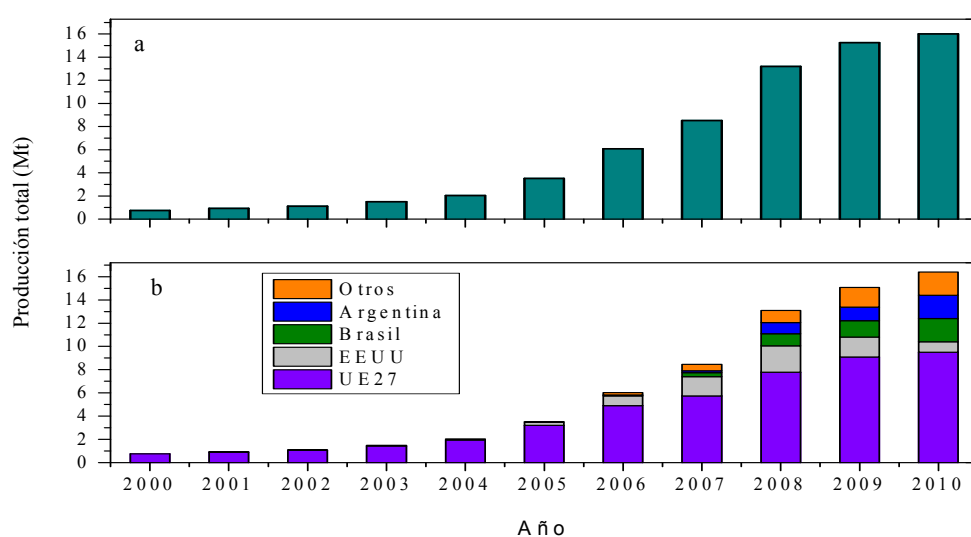
### **1.1.2.- Evolución de la producción de glicerina**

La escasez y agotamiento de fuentes de energías fósiles tradicionales, así como su influencia negativa sobre el medio ambiente causando impacto en el denominado cambio climático ha llevado a tomar medidas. Con la firma del Protocolo de Kyoto, en 1997, se ha visto en la necesidad de impulsar el desarrollo de fuentes de energías alternativas. Por esta razón, la UE estableció la política energética de fuente de energías renovables en el *Libro Blanco de la Comisión Europea* (LBC) en 1997. Como se ha mencionado anteriormente, con respecto al sector transporte, la UE promulgó la *Directiva 2003/30/CE* relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte. Así, para prolongar las acciones y establecer objetivos, la UE aprobó la *Directiva 2009/28/CE*. En este sentido, España elabora el *Plan de Acción Nacional en materia de Energías Renovables* (PANER) 2011-2020.

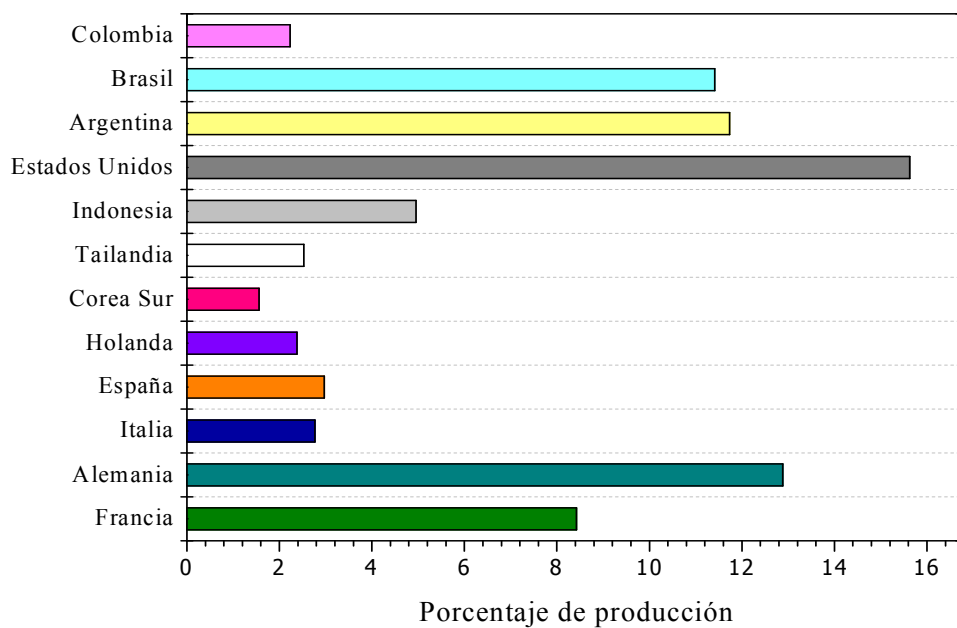
Debido a estas disposiciones regulatorias, los biocarburantes se han convertido en una firme alternativa de fuente de energía renovable para luchar contra la

insuficiencia y dependencia energética. En concreto, la producción de biodiesel aumentó considerablemente en los últimos años. En la Figura 1.6a se muestra la producción mundial biodiesel, se puede observar que la producción se incrementa de 0.8 Mt en el año 2000 hasta 16 Mt en el año 2010. Esta misma tendencia se puede observar en la Figura 1.6b, apreciándose que la UE es el mayor productor de biodiesel a nivel mundial; los países que aportan más producción en la UE son Alemania, Francia, Italia y España, como puede ser observado en la Figura 1.7. Se estima que la producción de biodiesel mundial para los próximos años seguirá creciendo (Biofuels Platform, 2012; Gholami y col., 2014; Torres y Carrera, 2010).

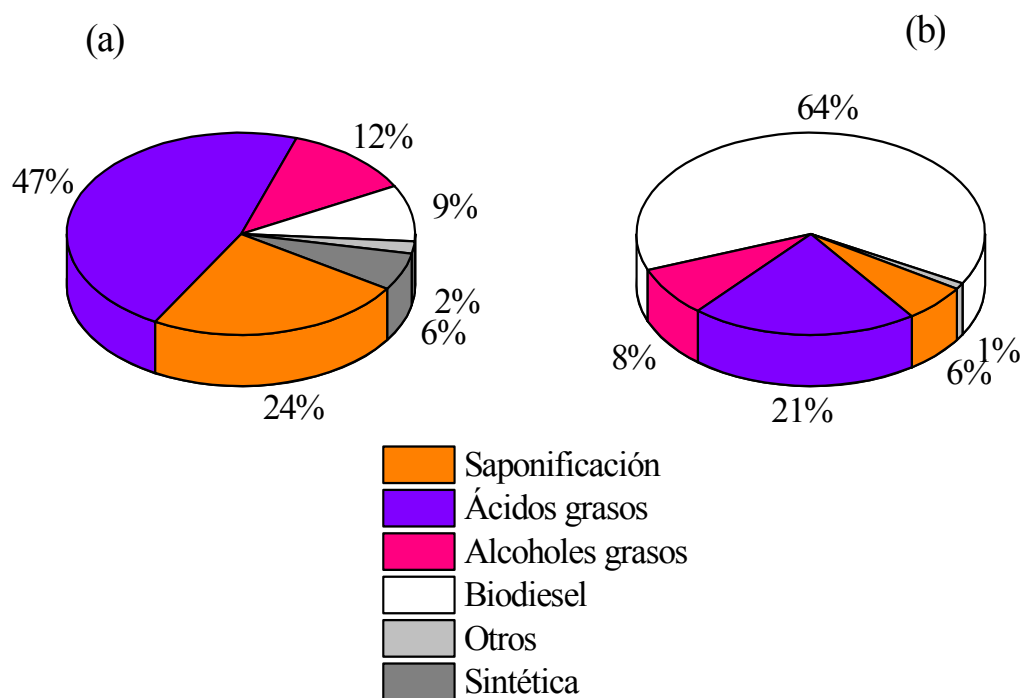
Como consecuencia del aumento en la producción del biodiesel, el mercado de la glicerina ha experimentado grandes cambios. El primero ha sido el cambio en las fuentes de obtención de la glicerina. En la Figura 1.8 se aprecia que, en el año 1999, el 47% de la glicerina procedía de la industria de ácidos grasos, seguida de la saponificación. Hasta el año 2003, la industria de ácidos grasos era el mayor proveedor (Ayoub y col., 2012); a partir de este momento, el peso de estas industrias fue disminuyendo paulatinamente, y también de las otras fuentes de obtención, como se puede observar; para el año 2009, la obtención de glicerina sintética prácticamente desaparece, debido a que Dow, en el año 2006, cerró su planta de glicerina sintética (Aragón y col., 2010), mientras que el mayor proveedor, con un 64%, fue la industria de biodiesel en el 2009, debido al incremento de esta industria durante los últimos años por las razones mencionadas anteriormente.



**Figura 1.6.** Evolución de la producción de biodiesel a) mundial y b) total producido por cada país (Adaptado de Lamers y col., 2011)



**Figura 1.7.** Porcentaje de producción de biodiesel en diferentes países en el año 2011. (Gholami y col., 2014)

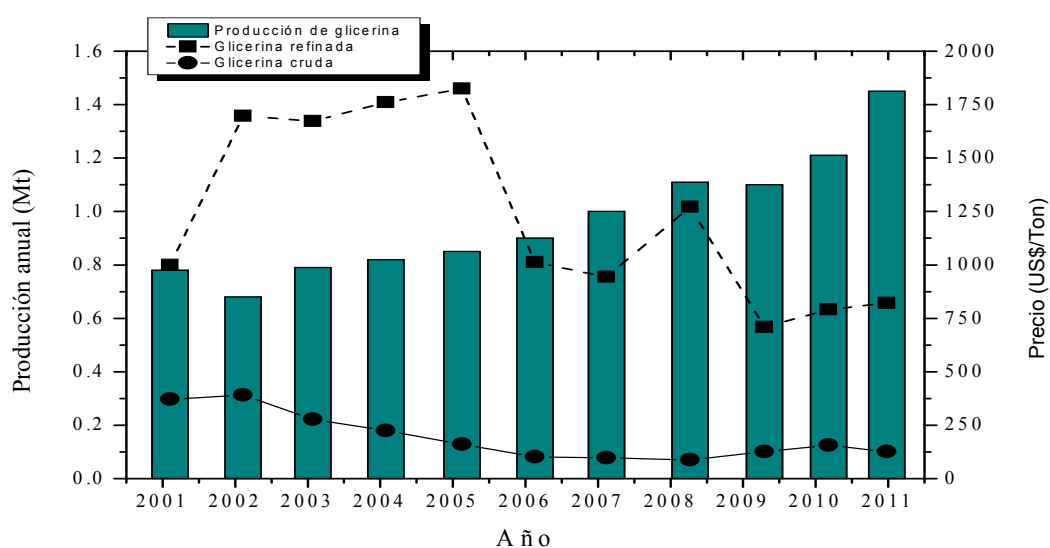


**Figura 1.8.** Principales procesos de obtención de glicerina años (a) 1999 y (b) 2009. (Ciriminna y col., 2014)



El mercado de la glicerina se ha caracterizado por presentar, a lo largo de los años, grandes cambios producidos por la oferta y la demanda de este producto. En la Figura 1.9 se puede ver la evolución de la producción anual de la glicerina, así como los precios de la glicerina refinada y cruda durante el periodo 2001-2011. Como se puede observar, hay un incremento en la producción de la glicerina, con una ligera caída en los precios de la glicerina cruda; partir del año 2002, disminuye el precio hasta el año 2007, a partir de este año los precios se han mantenido prácticamente estables, a pesar del incremento de la producción de glicerina. En cuanto a la glicerina refinada se observa una caída significativa en su precio desde el año 2005 hasta el 2007; sin embargo, su precio aumenta en el año 2008, debido al desequilibrio entre la oferta y la demanda durante ese año; además del aumento en el precio de la materia prima (semilla de aceite) (Ayoub y col., 2012); a partir de este momento el precio de la glicerina se ha mantenido estable.

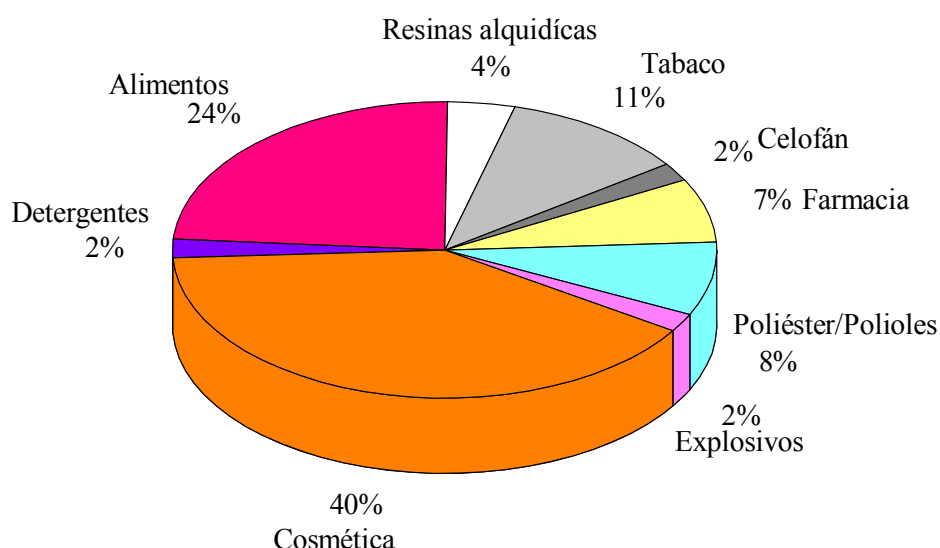
En consecuencia, el incremento de la producción de glicerina proveniente de la industria de biodiesel ha impactado negativamente en su mercado, estos precios tan bajos en la glicerina podrían convertir este producto en un residuo (Gholami y col., 2014). Por esta razón, se están considerando nuevas aplicaciones de glicerina cruda por transformación en productos de valor añadido y de esta manera se podría mejorar la rentabilidad de plantas de producción de biodiesel. Además, la glicerina puede ser utilizada para producir otros muchos compuestos, está considerada como *platform chemical* (Ayoub y col., 2012; Ciriminna y col., 2014)



**Figura 1.9.** Producción anual de la glicerina y precios de la glicerina ruda y refinada (Quispe y col., 2013)

### 1.1.3.- Aprovechamiento de la glicerina

La glicerina es un compuesto no tóxico, no irritante y biodegradable, con una alta estabilidad y compatible con muchas otras sustancias. Por tanto, tiene una amplia variedad de aplicaciones industriales (más de 1500 aplicaciones). Por su gran versatilidad y bajo coste, la glicerina ha sustituido al sorbitol y pentaeritritol (Kirk y col., 2007). En la Figura 1.10 se presenta el campo de aplicación de la glicerina refinada, como se puede observar los sectores que aglutinan el mayor grueso de las aplicaciones de este compuesto son: la industria cosmética, la alimentaria, la tabaquera, la farmacéutica y la de polímeros. Estas cinco industrias suman el 75% del consumo de glicerina refinada.



**Figura 1.10.** Aplicaciones industriales de glicerina (Pagliaro y col., 2007)

En la industria cosmética, un 40% del consumo de glicerina refinada es usada en los productos de higiene (17%) y cuidado (23%) personal; por su buena solubilidad se emplea como lubricante, humectante, emulgente (en cremas) y suavizante (en jabones), es el mayor ingrediente en las cremas dentales por su viscosidad y sabor dulce. En la industria alimentaria, un 24% de glicerina refinada se usa principalmente como humectante, disolvente, edulcorante, lubricante, conservante de alimentos y complemento alimentario deportivo (U.S. Soybean Export Council, 2007). En la industria tabaquera, un 11% de la demanda de glicerina refinada es para su utilización como humectante en la fabricación de tabaco. En la industria farmacéutica, el 7% de la

glicerina refinada se usa como disolvente en la manufactura de medicamentos, humectante en pastillas, preparaciones de analgésicos, jarabes, elixires, plastificante en el encapsulado de medicina, vasodilatadores (nitroglicerina) y tranquilizantes (guaiacolato de glicerina)

En cuanto a su uso en la síntesis de derivados, las industrias alimentaria y cosmética han desarrollado aplicaciones usando la glicerina purificada. En el sector alimentario, puede utilizarse como materia prima para la síntesis de ácido cítrico (aditivo alimentario sobre todo en bebidas frías) y de ácido láctico (las sales y ésteres de dicho ácido son aplicadas en el sector) (Fan y col., 2010), síntesis de triacetín (Németh y col., 2008). En la industria cosmética, se aplica para obtener poli-gliceril-ésteres y acetales (Németh y col., 2008), u otros productos, como la 1,3-dihidroxiacetona (DHA), usada en cremas bronceadoras (Ciriminna y col., 2006). De igual manera, la industria de polímeros y de plásticos, se usa para obtener monómeros, como acetales (Zhou y col., 2008), el 1,3-propanodiol, usado en la síntesis de plásticos biodegradables (Saxena y col., 2009); en la industria resinera se usan los ésteres de glicerol con ácidos resínicos (Ladero y col., 2011). En la producción de compuestos químicos básicos, se incluye su uso para obtener etanol y acroleína (Fan y col., 2010; Jarvis y col., 1997). Las propiedades del biodiesel pueden ser mejoradas mediante aditivos, sintetizados a partir del glicerina, como sus quetales (Norhasyimi y col., 2010).

Los sectores tradicionales, farmacéutico, alimentario y cosmético, no producen una demanda suficiente para resolver los problemas que actualmente tiene la glicerina, ya que requieren de una glicerina purificada en sus aplicaciones, por tratarse de productos que van dirigidos básicamente al consumo humano. Por esta razón, se han desarrollado investigaciones que contemplan el uso de la glicerina cruda como *platform chemical* en términos de transformación de productos con valor añadido (Aragón y col., 2010; Ayoub y col., 2012; Behr y col., 2008; Ciriminna y col., 2014; Gholami y col., 2014; Len y col., 2014; Pagliaro y col., 2008b; Quispe y col., 2013; Tan y col., 2013; Zhou y col., 2008), así como también su uso en el sector energético. Así, las posibilidades de obtención de productos derivados de la glicerina con alto valor añadido son muy amplia, tal como se refleja en las Figuras 1.11 y 1.12, donde se muestran los principales procesos químicos y los productos obtenidos en cada uno de ellos. Por tanto, por rutas fermentativas (microbiológicas) y químicas, se pueden producir derivados de la glicerina con aplicaciones en detergentes, aditivos alimentarios, productos

cosméticos, lubricantes, entre otros. Por tratarse del objeto de esta Memoria la obtención de monoglicérido de ibuprofeno, un estudio más detallado del estado del arte se realizará en secciones subsiguientes.



Figura 1.11. Valorización del glicerol por vía química



Figura 1.12. Valorización del glicerol por vía microbiológica

#### **1.1.4.- Esterificación de glicerina**

La reacción de esterificación ocurre entre un ácido carboxílico y un alcohol para producir un éster y agua. Es una reacción reversible, por lo que no llegan a desaparecer por completo los reactivos; por lo tanto, algunos autores sugieren desplazar el equilibrio de la reacción para favorecer la formación del éster usando distintas técnicas: uso de pervaporación, eliminando el agua utilizando altas temperaturas o vacío, provocando el cambio de estado de un producto, tamices moleculares o sales higroscópicas (Petkar y col., 2008; Urtiaga, 2003; Wang, 2007); también se ha considerado un exceso de alcohol (Wolfson y col., 2007). Con respecto al alcohol, suelen emplearse los de cadena corta como el metanol y etanol, ya que reaccionan más rápido por ser moléculas más pequeñas. En el caso de estudio, se utilizó como alcohol la glicerina, debido a las consideraciones establecidas en párrafos anteriores. La esterificación de glicerina con ácidos (carboxílicos, grasos, fenólicos, etc.), debido a la presencia de los tres grupos hidroxilos en la glicerina, el producto de esta reacción suele ser una mezcla de mono, di, y triglicéridos, su cantidad varía en función de las condiciones de reacción y del catalizador (Zhou y col., 2008). De manera general, las aplicaciones de los ésteres de glicerina son numerosas tales como emulsionantes, lubricantes, alimentarios, diluyente de perfumes, agentes dispersantes, disolventes para principios activos, recubrimientos en alimentos, vehículo para inyectables, etc. Además, los mono, di y triglicéridos (ésteres de glicerina) son ampliamente usados en la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica, del plástico y los adhesivos.

La esterificación puede realizarse por vía térmica, catalítica y enzimática. La esterificación térmica es siempre deseable, ya que ocurre en ausencia de un catalizador, pero tiene el inconveniente que ocurre a altas temperaturas y suele ser una reacción lenta. En la literatura ha sido estudiada la esterificación de la glicerina con ácido cinámico y metoxycinámico por vía térmica a temperaturas de 150 y 200 °C, para la obtención de monoglicéridos y diglicéridos usados como filtros ultravioleta en cosméticos y cremas solares (Molinero y col., 2013). También ha sido estudiada la esterificación de glicerina con ácidos resínicos en la obtención de triglicéridos de ácido resínicos usados en la industria de adhesivos (Ladero y col., 2012).

La esterificación por vía catalítica puede ser en presencia de catalizadores homogéneos y heterogéneos (Soltes y col., 1989). Los catalizadores pueden ser tanto

ácidos como básicos, generalmente se usan los tipo ácido ya que tienen a ceder protones al ácido carboxílico. Los catalizadores homogéneos ácidos más empleados son los ácidos de Brönsted (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PTSA, HBr, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Sin embargo, al estar disueltos en el medio de reacción, su separación suele ser bastante costosa. Por otro lado, los catalizadores ácidos heterogéneos, como las resinas de intercambio iónico (Amberlyst, Lewatit, entre otras), pueden separarse más fácilmente (por filtración) y son reutilizables (acidificándolas para un nuevo uso). En este sentido, el catalizador homogéneo PTSA y el catalizador heterogéneo de mesoporos con grupos sulfónicos (mesopo-S-fenil-end-SO<sub>3</sub>H) han sido usados en la esterificación de glicerina con el ácido p-metoxicinámico y metoxicinámico, en la obtención de mono y diglicéridos de estos ácidos (Molinero y col., 2014).

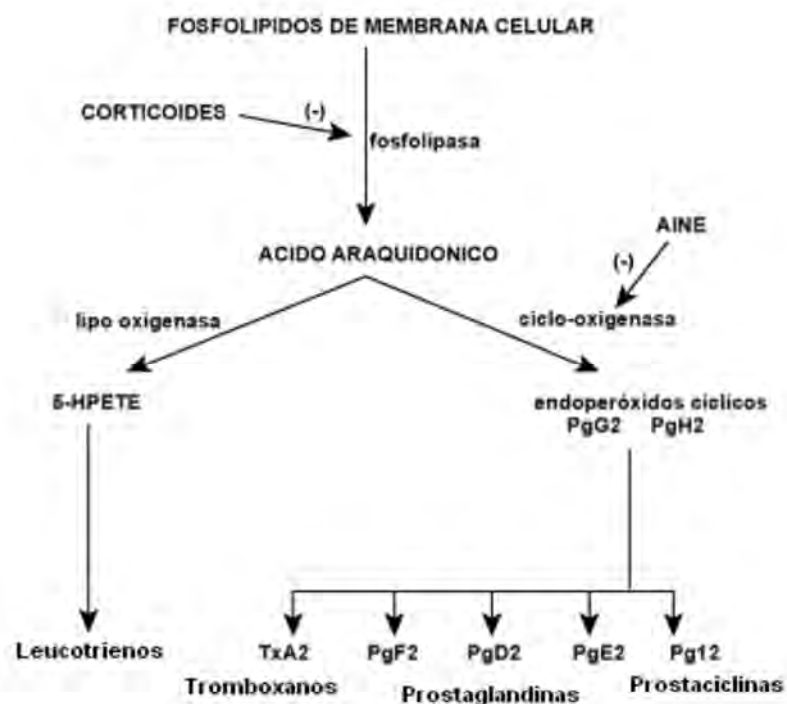
La esterificación por vía enzimática es cada vez más utilizada debido a sus condiciones suaves de operación de temperatura y presión, las enzimas son catalizadores específicos y selectivos, como ya se ha explicado. Entre las enzimas más usada se encuentran las lipasas, especialmente la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) o su derivado comercial el inmovilizado Novozym 435, que es producido por la empresa Novozymes (Yahya y col., 1998). Esta enzima es muy selectiva para la formación de mono, di y triglicéridos cuando el agente acilante es un ácido de tipo aromático. Las enzimas CALB y Novozym 435 han sido empleadas en la obtención de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácido benzoico (Tamayo, 2014; Tamayo y col., 2012), en la obtención de triglicéridos de ácido 4-fenilbutírico y ácidos fenilalcanoicos con Novozym 435 (Chang y col., 2009), y también se ha empleado la Novozym 435 en la esterificación de glicerina con triacetin (Wolfson y col., 2007).

## 1.2.- ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEOS

Los antiinflamatorios naturales, segregados por el propio organismo son derivados de los corticoides, sustancias de origen esteroideo de potente acción antiinflamatoria e inmunosupresora; mientras que, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un conjunto heterogéneo de fármacos con estructuras químicas muy distintas y no necesariamente relacionadas entre sí, que poseen propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, con la finalidad de reducir los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre, respectivamente. Esta diversidad química les confieren propiedades farmacocinéticas distintas; sin embargo, comparten algunas

actividades terapéuticas y efectos adversos relativamente frecuentes (Prieto, 2007). Los AINEs representan uno de los grupos farmacológicos más prescritos en todo el mundo; son usados en tratamientos de inflamación, dolor y edema, también en artritis reumatoide, artrosis de diversos tipos, mialgias, cefalalgias, artralgiás, dismenorrea y otras aplicaciones menores. Además, estudios epidemiológicos y experimentales ha documentado los efectos benéficos de los AINEs en tratamientos de cáncer de colón-rectal (Ahnen, 1998) y la enfermedad de Alzheimer (Imbimbo y col., 2010).

En cuanto al mecanismo de acción de los AINEs se puede apreciar en la Figura 1.13, tal como fue descrito por Vane y Piper en 1971; estos autores, demostraron que los AINEs inhiben la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX), a partir del ácido araquidónico, resultando en una disminución de la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (A2), los cuales son conocidos mediadores celulares en los procesos inflamatorios (Philip, 2012).



**Figura 1.13.** Mecanismo de acción de AINEs. Adaptado de (Rao y col., 2008)

Sobre el trabajo original de Vane y Piper (1971) existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa: la COX-1 y la COX-2. La primera es una enzima constitutiva que está presente en el riñón, la mucosa del estómago y el duodeno; en estos tejidos la COX-1 lleva a cabo la síntesis de prostaglandinas que actúan como citoprotectores

gástricos y renales, y en la regulación de la agregación plaquetaria, entre otras acciones. La COX-2 es una enzima inducida que está presente en el cerebro, pulmón, páncreas, placenta y ovarios; esta enzima se expresa en respuesta a los procesos inflamatorios y estimula la síntesis de prostaglandinas que produce fiebre, dolor o inflamación. De acuerdo a su mecanismo de acción (Ver Tabla 1.3) los AINEs se pueden clasificar como:

- AINEs tradicionales que inhiben no selectivamente la enzima COX-1 y COX-2, en mayor medida a la COX-1, lo cual trae como consecuencia los efectos secundarios a nivel de tracto gastrointestinal, renal y coagulación.
- AINEs selectivos de la COX-2.
- AINEs inhibidores preferenciales de la COX-2.

Los AINEs generalmente tienen biodisponibilidad después de ser administrados por vía oral, se absorben, pero su velocidad de absorción varía entre los AINEs, debido a diferencias en sus propiedades farmacocinéticas.

**Tabla 1.3.** Clasificación de antiinflamatorios no esteroideos. Adaptado de (Prieto, 2007)

CLASIFICACIÓN	GRUPO	FÁRMACO
AINEs tradicionales	Derivados del Ácido arilpropiónico	Fenoprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, naxoprofen, ibuprofeno, ácido tiaprofénico.
	Derivado del Ácido Acético	<i>Arilacético</i> : Diclofenaco, Aceclofenac, Sulfindaco, Fentiazaco. <i>Pirrolacético</i> : Tolmentin, Ketorolac. <i>Indolacético</i> : Acemetacina, Indometacina. <i>Piranoacético</i> : Etodolaco.
	Derivado del Ácido N-arilantranílicos	Ácido meclofenámico, Ácido mefenámico.
	Derivados del ácido salicílico	Diflunisal
Inhibidores selectivos de COX-2	Coxibs	Celocoxib, Valdecoxib, Lumiracoxib
Inhibidores preferenciales de COX-2	Agentes no ácidos- Derivado naftilalcanona	Nabumetona
	Oxicanes	Meloxicam, Tenoxicam, Piroxicam
	Derivado piranoindolacético	Etodolac

Entre los efectos adversos más importantes de los AINES relacionado con el uso crónico, se pueden mencionar:



**a) Tracto gastrointestinal:** el uso crónico de los AINEs administrado por vía oral puede producir daños en la mucosa gástrica, conllevando a úlceras gástricas (Boyce y col., 2000; Modi y col., 2011). Estos efectos se asocian con la inhibición de la COX-1, dado que las prostaglandinas poseen un efecto protector de la mucosa gastrointestinal debido a que regulan el cambio y reparación celular, mantienen el flujo sanguíneo y estimulan la secreción de mucus y bicarbonato. El efecto erosivo está asociado a algunos AINEs (ácidos débiles), que se convierten en liposolubles a un pH bajo. Al ser administrados por vía oral cruzan la membrana lipídica y se ionizan dentro de las células de la mucosa gástrica perdiendo liposolubilidad, por tanto, se queda en el interior celular interrumpiendo la función celular por afectar múltiples rutas celulares como la fosforilación oxidativa mitocondrial, la síntesis de ATP, y el intercambio de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ ), entre otras.

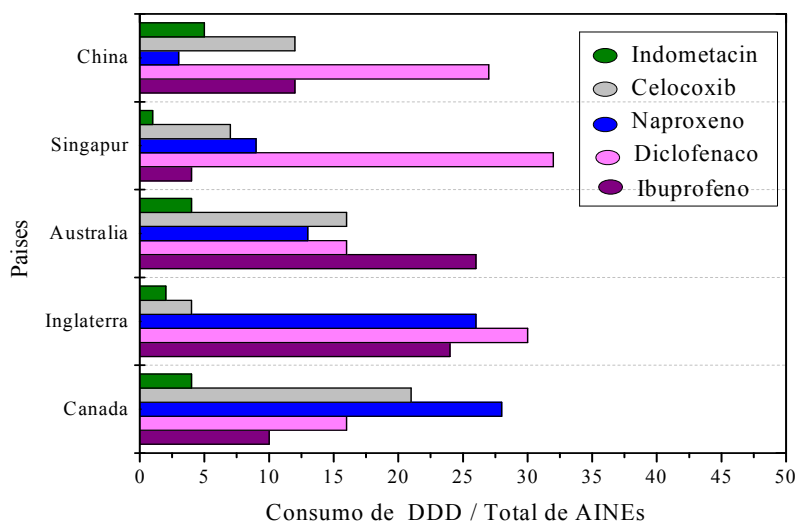
**b) Efecto antiagregante-trombótico:** los AINEs inhibidores selectivos de la COX-2 no inhiben la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, por ende, podrían incrementar el riesgo de trombosis. Además, estudios clínicos indican que los inhibidores selectivos de la COX-2 ejercen importantes efectos cardiovasculares adversos, que incluyen un aumento del riesgo de infarto del miocardio, accidente cerebrovascular, hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca (Baltlioni, 2010). Sin embargo, la mayoría de los AINEs tradicionales inhiben la COX-1 impidiendo la formación de tromboxano A<sub>2</sub>, el cual induce la agregación plaquetaria (Flórez, 1992). La aspirina es el AINE más antiguo, siendo usado predominantemente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, en dosis bajas.

**c) Efecto renal:** La inhibición de las prostaglandinas, generada por la acción de la COX-1, conduce a una disminución de la perfusión renal total y redistribución del flujo sanguíneo en la corteza de los riñones, proceso que culmina en vasoconstricción renal aguda, isquemia medular y, en ciertas ocasiones, en una insuficiencia renal (Baltlioni, 2010).

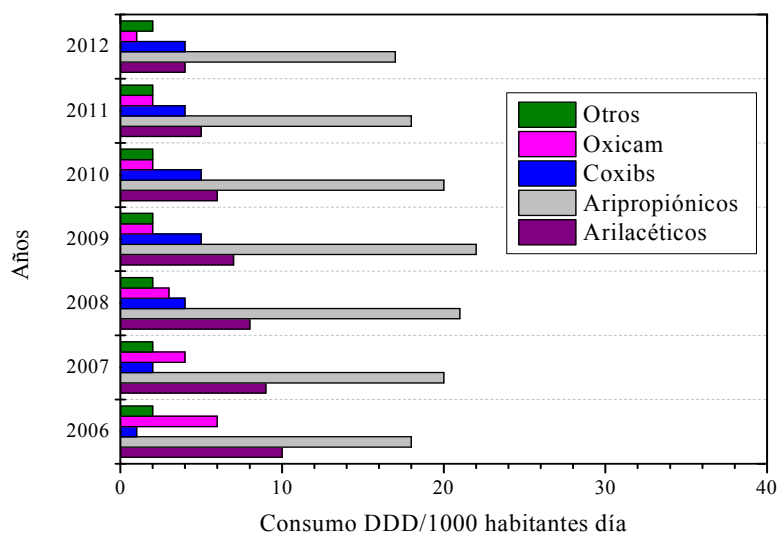
### **1.2.1.- Mercado de los AINEs**

Los AINEs son compuestos farmacológicos prescritos frecuentemente en todo el mundo (Prieto, 2007); así, su demanda crece año a año. En países como Canadá, China, Australia e Inglaterra, el consumo de AINEs es elevado (Figura 1.14). En España, los

AINes pertenecientes al grupo de los arilpropiónicos son los que presentan un mayor consumo (ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno y flurbiprofeno), seguidos por los arilacéticos (diclofenaco, ketorolac, etc.), entre los años 2006 y 2012 (Figura 1.15).



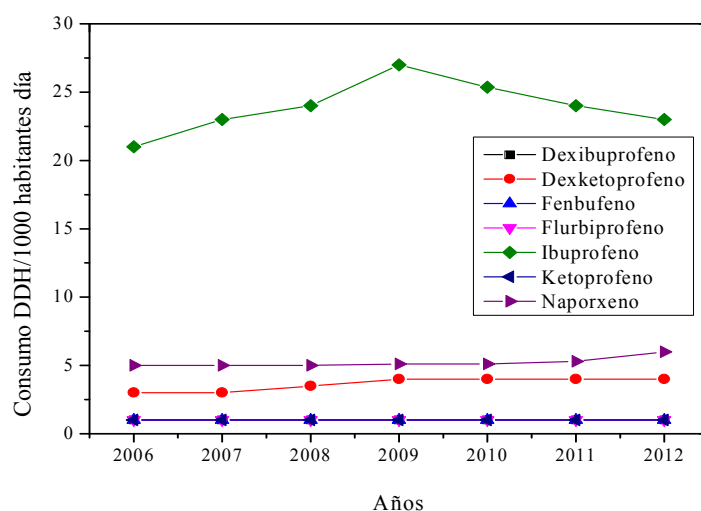
**Figura 1.14.** Consumo de AINEs en varios países durante el año 2011. Adaptado de (McGettigan y col., 2013)



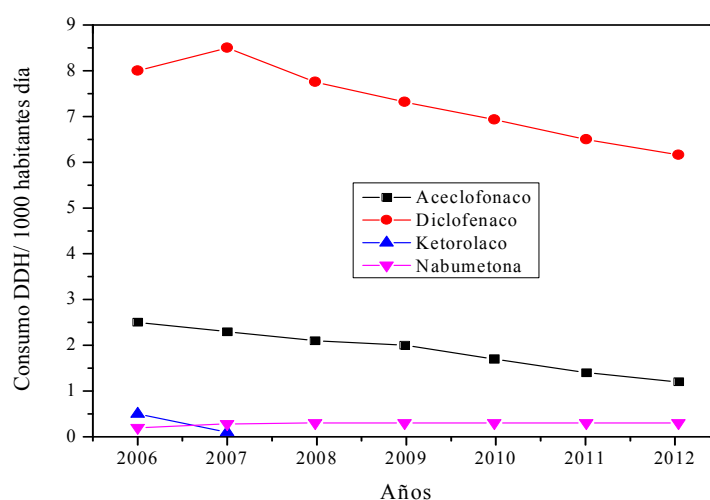
**Figura 1.15.** Consumo de AINEs en España. Adaptado de “Informe de utilización de medicamentos U/AIN/15012014”. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS, 2014)

En cuanto a los AINEs pertenecientes al grupo de los arilpropiónicos, en la Figura 1.16, se puede observar que el ibuprofeno fue el más utilizado y su consumo se incrementó de 21 DDH (dosis diarias habitantes) en el 2006 a 26,5 DDH en el 2009. A

partir de este año disminuyó hasta 21,5 DDH en el 2012, debido a la introducción en el mercado de Coxibs, inhibidores selectivos de la COX-2 (AEMPS, 2014). De igual manera, en la Figura 1.17 se muestra el consumo de los AINEs pertenecientes al grupo de los arilacéticos, se puede apreciar que el diclofenaco es el más consumido, a pesar de que a partir del año 2008 su consumo descendió progresivamente debido a que se relacionó el diclofenaco con incrementos de efectos trombóticos (AEMPS, 2014).



**Figura 1.16.** Consumo de AINEs perteneciente al grupo de los arilpropiónicos en España entre 2006 y 2012. Adaptado de “Informe de utilización de medicamentos U/AIN/15012014”. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS, 2014)



**Figura 1.17.** Consumo de AINEs perteneciente al grupo de los arilacéticos en España entre 2006 y 2012. Adaptado de “Informe de utilización de medicamentos U/AIN/15012014”. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS, 2014)

### 1.2.2.- Profármaco de AINEs

Un profármaco se define como un derivado bioreversible farmacológicamente inactivo de una molécula del fármaco que requiere de una transformación química o enzimática para liberar el fármaco precursor activo *in situ*, después de su administración (Chang y col., 2004; Halen y col., 2009). En los últimos años, los profármacos de AINEs han sido desarrollado para bloquear el grupo ácido carboxílico de los AINEs como una vía de reducir los efectos adversos del tracto gastrointestinal (Halen y col., 2009). Por tanto, un profármaco se debe caracterizar por ser totalmente inactivo, no ser tóxico, tener una bioactivación cuantitativa y rápida y una bioactivación hidrolítica y no hepática. Además, el desarrollo de profármacos mejora las siguientes características (Cabrera y col., 2010; Testa, 2009):

- a) Solubilidad, estabilidad química, propiedades sensoriales (tales como mal sabor u olor) o producir irritación o dolor. (De 1 a 4 (Color Rosa) de la Figura 1.18)
- b) Biodisponibilidad oral (bajos niveles de fármaco en sangre tras la ingestión oral). Se persigue aumentar la duración de acción del fármaco y conseguir el transporte selectivo a un órgano o tejido determinado. (De 5 a 8 (Color Azul) de la Figura 1.18)
- c) Toxicidad que afecta a algún órgano y su función (toxicidad sistémica). (De 9 a 11 (Color amarillo) de la Figura 1.18)

De esta manera, los profármacos se pueden clasificar en dos tipos (Won y col., 2006):

- Tipo I, el profármaco se convierte intracelularmente: donde se produce la conversión en forma activa es en tejidos o células diana para la acción farmacéutica (Tipo IA) y en tejidos metabólicos (Tipo B), ejemplos de este tipo son los antivirales análogos a los nucleósidos, ADEP/GDEP para quimioterapia.
- Tipo II, son aquellos que se convierten en zonas extracelulares, especialmente en los fluidos digestivos (Tipo IIA) o en la circulación sistémica (Tipo IIB).

En la síntesis para el desarrollo de profármacos, la reacción de esterificación es una vía efectiva, ya que un éster es químicamente estable *in vivo* (Halen y col., 2009). Además, un éster puede ser más soluble y biodisponible que el fármaco original (Qandil, 2012). En la actualidad, entre un 8 y un 10% de los fármacos aprobados en todo el mundo son profármacos (Camarasa y col., 2014). Así, los profármacos son

usados en diferentes áreas terapéuticas y tratamientos como antigripales (oseltamivir), antihipertensivos (enalapril), para úlcera péptica (omeprazol), antitumorales (capecitabina), antivirales (valaciclovir), como el antivirásico hepatitis C (sovaldi), etc.



**Figura 1.18.** Variables a considerar en el desarrollo de profármaco (Testa, 2009)

### 1.2.3.- Ácidos arilpropiónicos

Dentro de los antiinflamatorios no esteroideos, los ácidos 2-aril propiónicos (profenos) forman un grupo relativamente homogéneo por sus características físicas y farmacológicas. El primero utilizado fue el ibuprofeno, pero más tarde surgieron un gran número de derivados: naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, suprofeno, etc. Se utilizan en la artritis reumatoide, espondilitis anquilopoyéticas y en los ataques agudos de gota. Algunos también se emplean como analgésicos (ibuprofeno, naproxeno), a dosis inferiores a las recomendadas en las enfermedades reumáticas, y últimamente se ha popularizado su uso en el tratamiento de las dismenorreas.

Los profenos son moléculas que presentan un centro quiral, por tanto tienen dos enantiómeros que exhiben comportamiento distintos. Según su orientación espacial, con respecto al centro quiral, se puede distinguir: el enantiómero S (left hand) y el enantiómero R (right hand). Estos fármacos son comercializados como una mezcla racémica, de ambos enantiómeros.

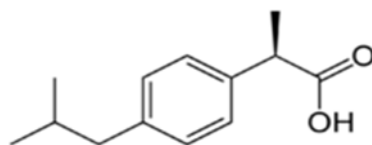
***Ibuprofeno***

El ibuprofeno, descubierto por el Dr. Stewart Adams en el Reino Unido en la década de 1950, se patentó en 1961 y estuvo disponible por primera vez en 1969. Inicialmente se otorgó la licencia de su fabricación a dos empresas farmacéuticas: Whitehall Laboratories, que vendió el producto bajo las marcas Advil y Upjohn. Después de la finalización de la patente junto con los derechos para comercializar, en 1986, los comprimidos de ibuprofeno se vende bajo multitud de nombres comerciales, siendo los más usuales son Advil, Nurofen y Motrin.

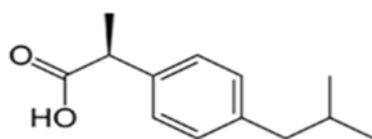
El ibuprofeno, ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico, pertenece a la familia de los profenos (ácido 2-arilpropionico), es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). El ibuprofeno es una molécula quiral que contiene un grupo carbono asimétrico en la segunda posición, es una mezcla racémica de dos enantiómeros R(-) y S (+) (Ver Figura 1.19). Sin embargo, la forma S (+)-ibuprofeno es 160 veces más activa que el R (-) ibuprofeno (Foresti y col., 2009); puede haberse demostrado que el R-ibuprofeno se convierte en S-ibuprofeno (Carvalho y col., 2006b), aunque hay discrepancias en este punto. El ibuprofeno inhibe las dos isoformas de la ciclooxigenasa, la COX-1 y COX-2, como se ha descrito anteriormente. Sus propiedades físico-químicas se muestran en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Propiedades químicas y físicas del ibuprofeno

Propiedad	Valor	Referencia
Fórmula Molecular	$C_{13}H_{17}O_2$	
Masa molar ( $g\ mol^{-1}$ )	206.29	
Temperatura de fusión, $T_{fus}$ ( $^{\circ}C$ )	74.0	(Gracin y col., 2002)
Entalpía de fusión, $\Delta H_{fus}$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	25.5	
Capacidad calorífica, $\Delta C_{p_{fus}}$ ( $J\ mol^{-1}$ )	50.3	
Entropía de fusión, $\Delta S_{fus}$ ( $J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ )	73.0	(Perlovich y col., 2004)
Entalpía de vaporización $\Delta H_{vap}$ ( $kJ\ mol^{-1}$ )	92.7	
Entropía de vaporización $\Delta S_{vap}$ ( $J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ )	173	
pKa	4.41	(Nerurkar y col., 2005)
	5.38	(Domanska y col., 2009)



S(+)-Ibuprofeno



R(-)-ibuprofeno

**Figura 1.19.** Estructura del ibuprofeno

A pesar de que el ibuprofeno es un principio activo muy potente y ampliamente usado clínicamente en el tratamiento del dolor y la inflamación, la administración a largo plazo del medicamento causa irritación y ulceración de la mucosa gastrointestinal, debido a la presencia en el ibuprofeno del grupo carboxílico (Zhao y col., 2006). Por tanto, la utilización de profármacos para enmascarar el grupo carboxílico del ácido 2-aril-propiónico, ha sido propuesta como un método para mejorar la biodisponibilidad del medicamento en cuanto a la optimización de su mecanismo de absorción, distribución, metabolización y excreción (Cabrera y col., 2010), conllevando la reducción de la irritación gastrointestinal, debido a que el profármaco se libera de forma más lenta en el tracto gastrointestinal, reduciendo la inhibición de las enzimas COX, enzima que cataliza la unión del oxígeno al ácido araquidónico, con lo que se inhibe la síntesis de tromboxano A2 y de las prostaciclinas, mediadores celulares responsables del proceso inflamatorio. Así, se han sintetizado, ya sea por reacción de esterificación profármacos de profenos, tales como: ésteres del flurbiprofeno (Mohan y col., 2007; Morrone y col., 1995), ésteres de ibuprofeno (Contesini y col., 2006; Foresti y col., 2009; Zhao y col., 2005; Zhao y col., 2006), ésteres de naproxeno (Chang y col., 2004; Morrone y col., 2010; Shang y col., 2003), y ésteres de ketoprofeno (Ong y col., 2006). En la actualidad, los profármacos han sido usado en suspensiones, emulsiones,

microemulsiones y nanoemulsiones (Zaghloul y col., 2013); por ejemplo, el gel de dexibuprofeno (Bergman y col., 2012), y derivados transdérmicos de ketoprofeno (Hartwig y col., 2009).

### 1.3.- ENZIMAS LIPASAS

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que han sido aisladas en microorganismos, plantas y animales. Pertenecen a un grupo de enzimas hidrolíticas cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o productos intermedios como mono y diglicéridos. Se caracterizan porque actúan bajo condiciones suaves, son muy estables en disolventes orgánicos, muestran una amplia especificidad de sustrato, y muestran generalmente alta regioselectividad y/o estereoselectividad (Hasan y col., 2006). También, en reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación sobre mezclas racémicas de alcoholes, compuestos polihidroxilados y ácidos propiónicos, las lipasas actúan con elevada regioselectividad y estereoselectividad (Perez, 2006).

Generalmente, la mayoría de las lipasas son producidas por los microorganismos en dos isoformas (isoenzimas), denominadas A y B. Estas isoenzimas son muy similares, mostrando la misma preferencia enantiomérica pero con ligeras diferencias estructurales que pueden conducir a diferencias de enantioselectividad. Casi todas las preparaciones de lipasas contienen ambas isoenzimas; la única excepción reseñable es la lipasa de *Candida antarctica* (CAL) para la que ambas isoenzimas están disponibles de forma separada por la Ingeniería Genética (Faber, 2011).

Ahora bien, las lipasas microbianas han recibido una atención especial debido a sus aplicaciones industriales, médicas y a su gran accesibilidad. Se pueden encontrar en bacterias, levaduras y hongos, y la mayoría son lipasas exocelulares, es decir, atraviesan la membrana celular una vez sintetizadas y pasan al medio externo. Las lipasas microbianas son glicoproteínas ácidas que contienen entre un 3% y un 15% de hidratos de carbono (glúcidos) en su estructura, preferentemente manosa. Es frecuente que un mismo microorganismo produzca varias isoenzimas; estas isoenzimas actúan en algunas ocasiones sobre sustratos diferentes y en la mayoría de los casos presentan diferencias en la velocidad de reacción y condiciones óptimas de operación (Arroyo, 1995).



Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y, las fuerzas de unión que permiten mantener su conformación nativa son débiles. Por tanto, con poca energía que se le aporte, la enzima pierde su conformación y, por ende, su actividad. Asimismo, la presencia de diferentes aminoácidos permite varias reacciones químicas conllevando a inactivación parcial o total de la enzima de forma reversible o irreversible (Klibanov, 1979). Así, la enzima puede perder su actividad por eliminación temporal de alguna molécula o ión que es fundamental para la actividad enzimática. Además, el desplegamiento de la enzima debido al rompimiento de los enlaces que mantienen activa su conformación, siendo estos dos procesos reversibles. Sin embargo, la enzima desplegada es más susceptible de reaccionar químicamente y, posteriormente, la enzima puede plegarse en una conformación inactiva, que suele ser irreversible.

En cuanto a la inactivación irreversible que se da en las enzimas esta puede ocurrir inter o intra-moleculares (Ghataora y col., 1994; Klibanov, 1983). La primera es debida a la agregación y la autólisis de la enzima, mientras que lo segundo se provocan por agentes externos, tales como: cambio de pH, la temperatura, agentes desnaturizantes (metales pesados,) por fuerzas mecánicas (*shear stress*), acción de agentes oxidantes, el enfriamiento, la congelación, las radiaciones, etc. En este sentido, es muy conocido que altas temperaturas pueden afectar la actividad enzimática. En literatura se ha descrito que la temperatura a la cual la enzima pierde su conformación se relaciona con la cantidad de agua asociada a la proteína (Turner y col., 2000). Por tanto, la estabilidad de las enzimas constituye uno de los aspectos más importantes para alcanzar una utilización óptima de las mismas en diversos procesos industriales. Así, con la inmovilización se puede conseguir enzimas más resistentes, reutilizables y se puede diseñar reactores enzimáticos de fácil manejo y control (Arroyo, 1995). En la literatura científica se han descrito técnicas de inmovilización de enzimas tales como: adsorción, entrecruzamiento, unión covalente y atrapamiento, usando como soporte distintos materiales orgánicos e inorgánicos (Cao y col., 2003; Klibanov, 1983; Sun y col., 2010; Tischer y col., 1999).

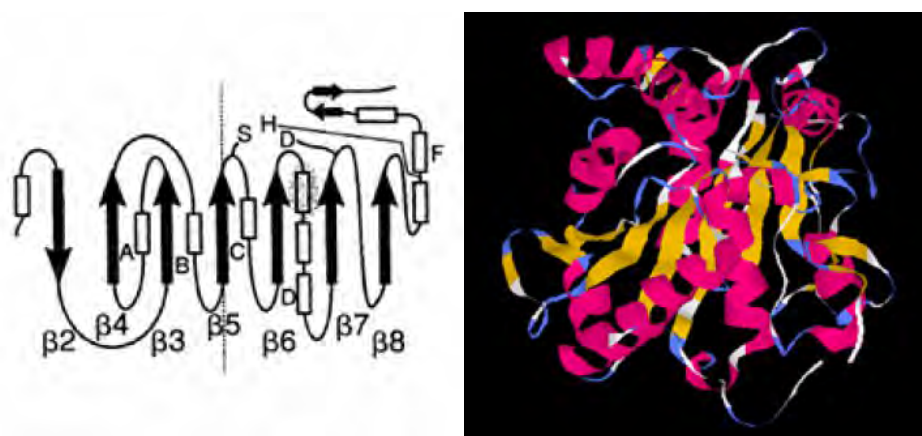
Por otra parte, se han propuesto varios modelos cinéticos que permiten describir el mecanismo de inactivación o desactivación enzimática (Lencki y col., 1992). De esta manera, se han considerado dos posibilidades, una lineal afectada por una especie intermedia y otra no lineal afectada por un grupo de sustancias intermedias. Los mecanismos lineales de desactivación consideran que una conformación de la enzima se

### 1.3.1.- Estructura y mecanismo de acción

Lipasa *Rhizous orizae* (Schmid y col., 1998)

Las lipasas tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis del enlace éster en la interfase, situada entre una fase lipóide (que constituye el propio sustrato) y una fase acuosa donde la enzima está disuelta. Por tanto, las lipasas son capaces de hidrolizar micelas y emulsiones, a diferencia de las esterasas (carboxil éster hidrolasas) que atacan a las moléculas de sustrato completamente solubles en agua (Desnuelle, 1972). Asimismo, las lipasas son enzimas lipolíticas activas únicamente cuando se encuentran sobre una interfase oleo-acuosa; fenómeno que recibe el nombre de activación interfacial (Reis y col., 2009).

Por otra parte, las lipasas presentan un elemento estructural diferenciador que no se conoce en otro grupo de enzimas. Este elemento estructural es una “tapa” formada por una porción helicoidal de la cadena polipeptídica que se coloca sobre el centro activo de la enzima cuando está inactiva (ver Figura 1.21). En presencia de una gota de aceite o de grasa, la tapa se mueve para permitir la interacción entre su cara hidrofóbica interna y los residuos hidrofóbicos que normalmente rodean el centro de la lipasa activa con esta superficie hidrofóbica. De esta manera, la lipasa interacciona con esta superficie hidrofóbica, y el centro activo está expuesto al medio de reacción (Rodríguez y col., 2010). Además, se forma un hueco oxianiónico donde se unirá el sustrato y será, también, el encargado de estabilizar el intermedio tetraédrico de la enzima.



**Figura 1.21.** Estructura tridimensional (derecha) de la lipasa *Candida antarctica* B resuelta por cristalografía de rayos X con indicación de la región de la tapadera. A la izquierda se representa la localización topológica de la misma lipasa (Perez, 2006)

### 1.3.2.- Aplicaciones de las lipasas

Las lipasas se obtienen de microorganismos, bacterias y hongos y son excretadas como enzimas extracelulares, las cuales tienen aplicaciones importantes en Biotecnología como catalizadores en la industria, en la Tabla 1.5 se muestran algunos ejemplos. Estas enzimas son capaces de catalizar la esterificación entre ácidos y alcoholes, también intervienen en reacciones de transesterificación, proceso donde hay intercambio de radicales acilo entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y otro éster (interesterificación) o un éster y un alcohol (alcoholólisis) (Reis y col., 2009). Las lipasas también son capaces de catalizar procesos de aminólisis para síntesis de amidas, tanto racémicas u ópticamente activas (Gonzalo, 2003). Se ha estudiado el uso de lipasas en reacciones de hidrazinólisis de ésteres, formándose hidracinas con buenos rendimientos (Yadav y col., 2010).

**Tabla 1.5.** Algunas lipasas comerciales (Jaeger y col., 1998).

Tipo	Fuente	Uso	Compañía comercializadora
Bacterias	<i>B. cepacia</i>	Síntesis orgánica	Fluka, Amano, , Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Aditivo para detergentes	Genecor
	<i>P. mendocina</i>	Aditivo para detergentes	Genecor
	<i>Ch. viscosum</i>	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts
Hongos	<i>R. miehei</i>	Procesado de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
	<i>C. antarctica</i>	Síntesis orgánica	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
	<i>C. rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>T. lanuginosus</i>	Aditivo para detergentes	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk

Así, en la hidrólisis y esterificación de glicerol y ácidos grasos de cadena larga, reacciones que generalmente se dan con un alto grado de selectividad, haciendo de las lipasas un importante grupo de biocatalizadores de la industria química, abarcando la industria de detergentes y de alimentos, las industrias farmacéutica, cosmética, y oleoquímica, la de síntesis orgánica, incluyendo la obtención de pesticidas, fungicidas y

aplicaciones biomédicas, además de las aplicaciones energéticas. En este último apartado, son de interés para la producción de biodiesel por transesterificación (Farinha y col., 2006; Luna y col., 2014; Mirosława y col., 2009). En la Tabla 1.6 se presenta un resumen de las aplicaciones de las lipasas en la industria. Además, las lipasas tienen un interés especial debido a que mantienen su actividad catalítica en disolventes orgánicos. Por tanto, se ha estudiado el empleo como biocatalizador en reacciones de esterificación, transesterificación, acilación regioselectiva de glicoles y mentoles, síntesis de péptidos y otros compuestos químicos donde se obtienen productos de elevado valor añadido para su aplicación en alimentación y cosmética

**Tabla 1.6.** Aplicación de lipasas en la industria

<b>Industria</b>	<b>Acción</b>	<b>Producto o aplicación</b>
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Eliminación de manchas de grasas en telas
Alimentos lácteos	Hidrólisis de grasas de leche, maduración del queso, y modificación de las grasas de mantequilla	Desarrollo de agentes saborizantes en la leche, queso y mantequilla
Alimentos de panadería	Agente saborizante	Prolonga la vida de productos en exposición
Bebidas	Agente aromatizante	Bebidas
Aditivos alimentos	Transesterificación	Creación de alimentos con menos grasa
Farmacéutica	Enantioselectivos, síntesis, transesterificación, esterificación	Compuestos quirales, lípidos selectivos, digestivos
Cosmética	Síntesis	Emulsificadores y humectantes
Papel	Hidrólisis	Papel de mejor calidad

Durante los últimos años, el uso de las lipasas como catalizadores industriales se ha incrementado. Se pueden encontrar numerosos ejemplos de la aplicación de lipasas en la síntesis enantioselectiva de fármacos (Hari Krishna y col., 2001; Larissegger-Schnell y col., 2006); en la resolución quiral de profenos, por ejemplo en la resolución

del (R,S)-ibuprofeno mediante esterificación enantioselectiva directa en medios orgánicos o hidrólisis enantioselectiva de su éster racémico (Carvalho y col., 2006a); también se ha empleado en la obtención de profármacos de fenilacetatos (Chang y col., 2009).

### **1.3.3.- Lipasas en medio orgánico**

En los procesos biológicos, el medio donde las enzimas actúan normalmente es el agua. Aquí, las enzimas se pliegan de tal forma que los aminoácidos apolares se sitúan en el interior, con los residuos polares en la superficie, donde se encuentran hidratados. Esta situación no existe en el seno de un disolvente orgánico, en el cual los residuos apolares son solubles y los hidrófilos y/o cargados son insolubles, con lo que la enzima es propensa a replegarse de forma inversa a su estado natural. Sin embargo, el uso de disolventes orgánicos como medio de reacción presenta las siguientes ventajas frente a su utilización en medios acuosos (Arroyo, 1995; Sharma y col., 2014):

- Se incrementa la solubilidad de reactivos y productos apolares.
- Se desplaza el equilibrio de la reacción de esterificación o transesterificación a favor del proceso.
- Se puede facilitar la recuperación de los productos de la reacción en disolventes de bajo punto de ebullición es más sencilla.
- Se facilita la recuperación de la enzima.
- Se evitan reacciones secundarias provocadas por el agua, como son la hidrólisis de los anhídridos de ácido utilizados como agentes acilantes, o la polimerización de las quinonas, utilizadas como regenerador de cofactores.
- Se mejora la estabilidad térmica de la enzima y también ante ácido o pH bajos.

Por otra parte, diversas investigaciones llevadas a cabo coinciden en señalar que la estructura enzimática en medio orgánico no se modifica, y por tanto, la actividad enzimática se mantiene. Así, Arroyo (1995) afirma que una enzima en medio orgánico sufre un atrapamiento cinético, debido a las interacciones hidrófobas producidas por la baja constante dieléctrica del medio, lo que permite el mantenimiento de la estructura

proteica. Además, Secundo y col. (2002) han comprobado que, tras liofilizar una disolución enzimática, dicha enzima mantiene la conformación que tenía al pH de la disolución de partida y dicha conformación se mantiene cuando la enzima liofilizada se utiliza en un medio con disolventes orgánicos. No obstante, ciertos trabajos han descrito que debe existir una cierta concentración de agua en el medio de reacción con la finalidad de mantener la estructura de la enzima y de esta manera no afectar la estabilidad y actividad enzimática cuando se usan disolventes orgánicos (Klibanov, 2001). En este contexto, dependiendo de la miscibilidad del disolvente en agua y la relación de este con el medio se pueden encontrar los siguientes sistemas (Doukyu y col., 2010):

- a) Cosolvente orgánico: el disolvente usado es inmiscible en agua, en este sistema se incrementa la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos y se reduce las limitaciones al transporte de materia, lo que conlleva un incremento en la eficiencia catalítica; además, se desplaza el equilibrio hacia la formación de los productos.
- b) Sistema bifásico: el sistema esta compuestos por dos fases, una acuosa que contiene a la enzima y otra orgánica inmiscible en agua, formándose una interfase. El sustrato y producto hidrofóbico se encuentran en la fase orgánica.
- c) Disolventes anhidros: en su forma nativa o libre las enzimas no son solubles en medio orgánico. En este sistema, hay que emplear enzimas liofilizadas o inmovilizadas, ya que se favorece la solubilidad de las enzimas en medio orgánico.

Por tanto, la naturaleza del disolvente orgánico afecta a las características catalíticas de las enzimas, en general, al aumentar la polaridad del disolvente disminuye la actividad de la enzima (Sun y col., 2010). Se ha comprobado que los disolventes polares pueden desactivar las enzimas al captar el agua esencial para el mantenimiento de la conformación enzimática activa o al penetrar hasta su núcleo hidrófobo (Doukyu y col., 2010). Con el fin de optimizar la actividad catalítica de las enzimas en medio orgánico se suele utilizar el parámetro  $\log P$  (coeficiente de partición del disolvente en un medio bifásico n-octanol/agua), como medida de la polaridad de los disolventes. Así se ha podido comprobar que la actividad enzimática es baja en disolventes cuyo  $\log P < 2$ , moderada si  $2 < \log P < 4$ , y alta si el  $\log P > 4$ . Aquellos disolventes con un  $\log P$  mayor de 4 no alteran la capa de agua esencial situada alrededor del biocatalizador, con

lo que éste permanece activo (Faber, 2011). En la Tabla 1.7 se muestra el valor del coeficiente de partición para algunos disolventes.

**Tabla 1.7.** Coeficiente de partición (Faber, 2011)

Disolvente	Coeficiente de partición (log P)
Dioxano	-1.10
Tolueno	2.50
Octano	4.50
Hexano	3.50
Xileno	3.75
2-butanol	0.60

#### 1.3.4.- Lipasa B de *Candida antarctica*

*Candida antarctica* es una levadura basidiomiceto que, como su nombre indica, se aisló en la Antártida con el propósito de encontrar enzimas capaces de operar en condiciones extremas para poder usarlas en formulaciones de detergentes (Michiyo, 1988). Su lipasa (CAL) es probablemente la más versátil de todas las lipasas empleadas en bioprocesos. Se producen dos formas isoenzimáticas de lipasa A y B; la lipasa isoenzima A es dependiente de iones metálicos  $\text{Ca}^{2+}$  y más termoestable, mientras que la lipasa isoenzima B es menos termoestable no dependiente de iones metálicos. Ambas isoenzimas han sido obtenidas en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspegillus oryzae*. La estructura de la lipasa B de *C. antarctica* (CALB) en su forma libre fue determinada por rayos X y está compuesta de 317 aminoácidos (Uppenberg y col., 1994). En la Figura 1.22 se muestra la estructura de la CALB libre.

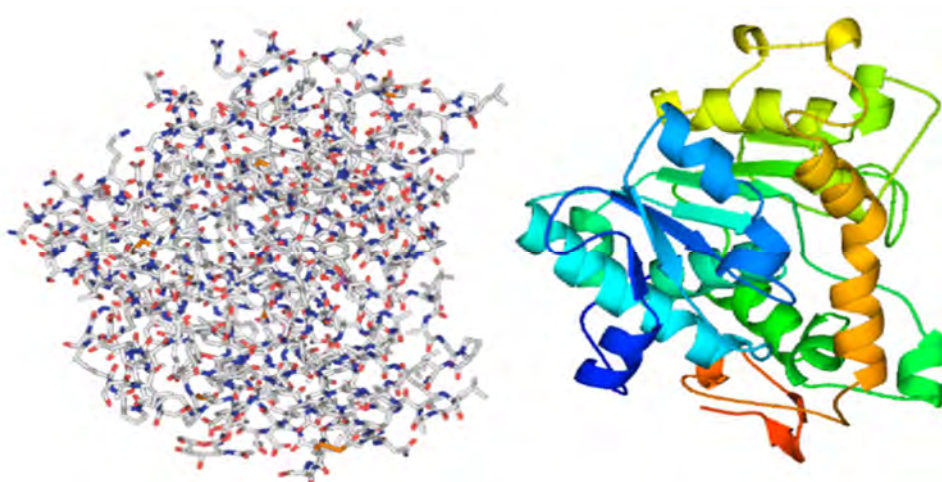
En la Tabla 1.8 se muestran las características correspondientes a cada una de las isoenzimas de la *C. antarctica*. Como todas las lipasas de estructura conocida, pertenece a la familia de proteínas de las hidrolasas  $\alpha/\beta$ . La CALB no presentar activación interfacial, es decir, que su actividad no se incrementa por exposición a una interfase agua-lípido. Esto se debe al hecho de que la enzima carece de la especie de tapa que regula el acceso al centro activo, una característica común en otras lipasas. Otra



característica que difiere de otras lipasas es la secuencia de aminoácidos alrededor de la serina, en la CALB se presenta una treonina en lugar de una glicina. Como la mayoría de las lipasas, su mecanismo de actuación es el de las hidrolasas serínica, una tríada catalítica serina-histidina-aspartato es la responsable de la acción catalítica, esquematizado en la Figura 1.20. El entorno del centro activo de la lipasa B está formado por una cavidad de 12Å de profundidad, que es su bolsillo hidrofóbico. En cuanto a la especificidad de sustrato varía bastante, la isoenzima A es altamente activa de manera no específica sobre triglicéridos; por el contrario, la isoenzima B presenta especificidad respecto a triglicéridos y es muy activa sobre un amplio rango de ésteres no naturales.

**Tabla 1.8.** Características de la lipasa de *Candida antártica* (Kirk y col., 2002)

Característica	CALA	CALB
Peso molecular (kDa)	45	33
Punto isoelectrico (pI)	7.5	6
pH óptimo	7	7
Actividad específica (LU mg <sup>-1</sup> )	420	435
Estabilidad pH	6-9	7-10
Activación interfacial	Si aunque baja	No

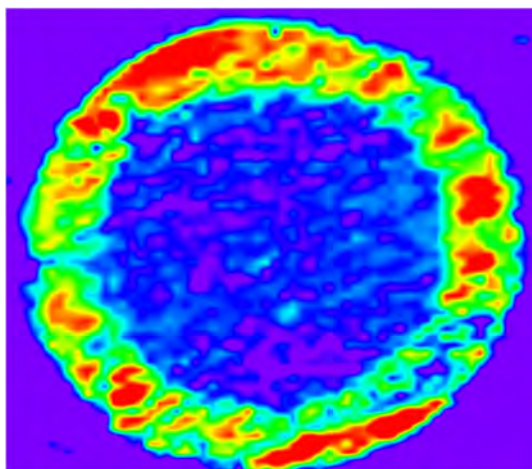


**Figura 1.22.** Representación esquemática de la lipasa B de *Candida antarctica*. A la izquierda: estructura de CALB con la secuencia de aminoácidos. A la derecha: visualización de estructura secundaria (hélices- $\alpha$  y láminas- $\beta$ ) y terciaria (conformación final de la CALB libre)

La CALB se presenta en diferentes preparados comerciales, entre los que destacan Lipozyme CALB como preparado de enzima en solución y Novozym 435, en sus grados técnico y alimentario, como preparado inmovilizado, ambos son producidos por Novozymes A/S. Las composiciones medias de los preparados enzimáticos Lipozyme CALB y Novozym 435 se muestran en la Tabla 1.9. Novozym 435 es muy tolerante al calor con una actividad máxima en el rango de temperatura de 70-80°C, aunque se recomienda su uso entre 40-60°C para una óptima productividad. En la Figura 1.23 se muestra una imagen en infrarrojos de la partícula de Novozym 435. Como se puede observar en esta figura, la enzima se distribuye en la parte externa de la partícula de biocatalizador.

**Tabla 1.9.** Composición del preparado comercial de la lipasa B de *C. antarctica* (datos de Novozymes A/S).

Enzima	Composición
Lipozyme CALB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sólidos enzimáticos: 4% en peso</li> <li>• Estabilizadores enzimáticos: glicerina (25%) y sorbitol (25%).</li> <li>• Agua (40%)</li> <li>• Aditivos: benzoato de sodio (0.2%) y sorbato de potasio (0.1%)</li> </ul>
Novozym 435	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmovilizada en resina acrílica macroporosa Lewatit VPOC 1600.</li> <li>• Diámetro de partícula: 0,3-0,9 mm</li> <li>• Actividad catalítica: 10000 PLU/g (propil laurate units “PLU”)</li> <li>• Contenido máximo de agua: 3% (w/w)</li> <li>• Superficie específica: 130 m<sup>2</sup>/g</li> </ul>



**Figura 1.23.** Imagen en infrarrojos de una partícula de Novozym 435 (Ying y col., 2003)

#### 1.4.- OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

El principal objetivo de la presente Memoria es el estudio cinético de varios procesos de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima comercial lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) en su forma libre e inmovilizada, para obtener monoéster de ibuprofeno, un posible profármaco del ibuprofeno. Como profármaco de este compuesto reduciría los efectos adversos de úlceras gastrointestinales causados por el uso crónico por vía oral.

Para la obtención del monoglicérido de ibuprofeno por vía enzimática se van a estudiar los siguientes sistemas enzimáticos multifásicos:

- **Sistema 1:** Esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa CALB en su forma libre con la propia glicerina como disolvente.
- **Sistema 2:** Esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa CALB en su forma libre, en presencia de un disolvente orgánico no miscible con la glicerina.
- **Sistema 3:** Esterificación de la glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa inmovilizada Novozym 435 en un medio libre de disolvente orgánico no polar.
- **Sistema 4:** Esterificación de la glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa inmovilizada Novozym 435 en presencia del mismo disolvente no miscible con glicerina que en el sistema 2.

Para el análisis de estos sistemas, se establecerá un procedimiento experimental para la obtención de datos experimentales fiables, operando en reactores discontinuos abiertos, con destilación del agua formada, y cerrados, donde se llevan a cabo los experimentos de esterificación de glicerina con ibuprofeno. Asimismo, se desarrollarán métodos analíticos que, aplicando varias técnicas cromatográficas y ópticas, permitan el seguimiento de la evolución temporal de los diferentes sistemas reaccionantes mencionados.

El estudio de la obtención del monoéster de ibuprofeno en los sistemas usando un catalizador homogéneo (Sistemas 1 y 2) y un catalizador heterogéneo (Sistemas 3 y 4) se llevará a cabo siguiendo una metodología que permita establecer la cinética de

dichos procesos. En consecuencia, en cada uno de los sistemas propuestos se plantea conseguir los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de las variables que pueden afectar la actividad y a estabilidad del biocatalizador en su forma libre e inmovilizada y, por ende, su efecto en la reacción de esterificación de glicerina e ibuprofeno. Las variables consideradas serán: concentración de enzima, concentración de ibuprofeno, concentración de agua, velocidad de agitación y temperatura. En el sistema 3 y 4, además, se evaluará la influencia de las limitaciones al transporte externo e interno, en la velocidad global de esterificación, al utilizarse un catalizador sólido.
2. Proponer un modelo cinético que permita describir los resultados obtenidos en cada uno de los sistemas citados. Para ello, después de plantear diversos modelos, se procederá a seleccionar el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos utilizando diversos criterios físicos y estadísticos.

## 1.5.- REFERENCIAS CITADAS

- AEMPS (2014). Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE) en España durante el periodo 2000-2012. . Consultado en :[www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es).
- Ahnen, D. (1998). Colon Cancer prevention by NSAIDs: what is the mechanism of action? *European Journal of Surgery* **164** (12): 111-114.
- Aragón, O. y D. Montoya (2010). Bioprocesos aplicados a la valorización del glicerol residual en la producción de Biodiesel. *Revista Palmas* **31** (especial): 126-135.
- Arroyo, M. (1995). Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Ayoub, M. y A. Z. Abdullah (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16** (5): 2671-2686.
- Baltlioni, M. (2010). Antiinflamatorio no esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **94** (4): 538-546.
- Batovska, D., T. Kishimoto, V. Bankova, Z. Kamenarska y M. Ubukata (2005). Synthesis of Some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu Protocol. *Molecules* **10** (3): 552-558.
- Behr, A., J. Eilting, K. Irawadi, J. Leschinski y F. Lindner (2008). Improved utilisation of renewable resources: new important derivatives of glycerol. *Green Chemistry* **10** (1): 13-30.
- Bergman, J. S., S. Devarajan, S. Ramalingam y A. V. Palanisamy (2012). Composition of dexibuprofen transdermal hydrogel. *Google Patents*.
- Biofuels Platform. (2012). Production of biofuels in the world in 2009. Retrieved 9/02/2012, from <http://www.biofuels-platform.ch>.
- Boyce, E. y L. Takita (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Review of factors guiding formulary selection. *Formulary* **35** (2): 142-168.
- Brewster, P. (1987). Glycerol esters as Fuel Economy Additives *Google Patents*. **US4683069 A**.
- Cabrera, S. y A. Diez-Torrubia (2010). Profármacos: pasado, presente y futuro. *Anales de Química* **106** (3): 207-214.
- Camarasa, M. J., S. De Castro y S. Velázquez (2014). Diseño y desarrollo de una novedosa estrategia profármaco basada en la enzima DPPIV/CD26. *Anales de Química* **110** (3): 195-203.
- Cao, L., L. V. Langen y R. A. Sheldon (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? . *Current Opinion in Biotechnology* **14** (4): 387-394.
- Carvalho, P. d. O., F. J. Contesini y M. Ikegaki (2006a). Enzymatic resolution of (R, S)-ibuprofen and (R, S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Brazilian Journal of Microbiology* **37** (3): 329-337.
- Carvalho, P. O., Q. B. Cass, S. A. Calafatt, F. J. Contesini y R. Bizaco (2006b). Review- Alternatives for the separation of drug enantiomers: Ibuprofen as a model compound. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **23** (3): 291-300.
- Ciriminna, R., G. Palmisano, C. D. Pina, M. Rossi y M. Pagliaro (2006). One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron Letters* **47** (39): 6993-6995.

- Ciriminna, R., C. D. Pina, M. Rossi y M. Pagliaro (2014). Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology* **116** (10): 1432-1439.
- Contesini, F. J. y P. de Oliveira Carvalho (2006). Esterification of (RS)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry* **17** (14): 2069-2073.
- Chang, C.-S., C.-C. Su, J.-R. Zhuang y S.-W. Tsai (2004). Enhancement of enantioselectivity on the synthesis of (S)-naproxen morpholinoalkyl ester prodrugs in organic solvents using isopropanol-dried immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **30** (3): 151-157.
- Chang, C.-S. y P.-L. Wu (2009). Synthesis of triglycerides of phenylbutyric acids by lipase-catalyzed glycerolysis in a solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **61** (3-4): 117-122.
- Desnuelle, P. (1972). *The Enzymes* Boyer, PD3, Academic Press, New York.
- Domanska, U., A. Pobudkowska, A. Pelczarska y P. J. Gierycz (2009). pK(a) and Solubility of Drugs in Water, Ethanol, and 1-Octanol *Journal of Physical Chemistry B* **113**: 8941-8947.
- Doukyu, N. y H. Ogino (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal* **48** (3): 270-282.
- Faber, K. (2011). *Biotransformations in organic chemistry: a textbook*. Springer Science & Business Media.
- Fan, X., R. Burton y Y. Zhou (2010). Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals – Mini Review. *The Open Fuels & Energy Science Journal* **3**: 17-22.
- Farinha, H., A. S. Aamer y H. Abdul (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **3**: 235-251.
- Flórez, J. (1992). *Farmacología Humana*. Ediciones Científicas y Técnicas. Barcelona-España.
- Foresti, M. L., M. Galle, M. L. Ferreira y L. E. Briand (2009). Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **84** (10): 1461-1473.
- Ghatorae, A. S., M. J. Guerra, G. Bell y P. J. Halling (1994). Inactivation of enzymes by organic solvents: New technique with well-defined interfacial area. *Biotechnology and bioengineering* **43** (4): 331-336.
- Gholami, Z., A. Z. Abdullah y K.-T. Lee (2014). Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **39** (0): 327-341.
- Gonzalo, C. (2003). Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéuticos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Oviedo.
- Gracin, S. y A. Rasmuson (2002). Solubility of phenylacetic acid, p-Hydroxyphenylacetic acid, p-Aminophenylacetic Acid, p-Hydroxybenzoic Acid, and Ibuprofen in pure solvents. *Journal of Chemical and Engineering* **47** (6): 1379-1383.
- Gunstone, F. (2009). *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses*. John Wiley & Sons.
- Halen, P., M. Prashant, R. Giridhar y M. R. Yadav (2009). Prodrug designing of NSAIDs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **9** (1): 124-139.

- Hari Krishna, S. y N. G. Karanth (2001). Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547** (2): 262-267.
- Hartwig, R. y D. Houze (2009). Transdermal delivery of ketoprofen polar derivatives. *Google Patents*. **CA2667477A1**.
- Hasan, F., A. Shah y A. Hameed (2006). Industrial application of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 235-251.
- Imbimbo, B., V. Solfrizzi y F. Panza (2010). Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment? *Frontiers in Aging Neuroscience* **2** (19): 1-14.
- Israel, A. U., I. B. Obot y J. E. Asuquo (2008). Recovery of Glycerol from Spent Soap Lye by - Product of Soap Manufacture. *E-Journal of Chemistry* **5** (4): 940-946.
- Jaeger, K. E. y M. T. Reetz (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* **16** (9): 396-403.
- Jarvis, G. N., E. R. Moore y J. H. Thiele (1997). Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 166-174.
- Kirk, O. y M. Würtz Christensen (2002). Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin *Organic Process Research & Development* **6**: 446-451.
- Kirk, R. y E. Othmer (2007). Encyclopedia of Chemical Technology. (5ta edition, Sons J.W. New York).
- Klibanov, A. M. (1979). Enzyme stabilization by immobilization. *Analytical Biochemistry* **93**: 1-25.
- Klibanov, A. M. (1983). Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation. *Advances in Applied Microbiology* **29**: 1-28.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-246.
- Ladero, M., M. De Gracia, J. Tamayo, I. Lopez de Ahumada, F. Trujillo y F. García-Ochoa (2011). Kinetic modelling of the esterification of rosin and glycerol: Application to industrial operation. *Chemical Engineering Journal* **169**: 319-328.
- Ladero, M., M. de Gracia, F. Trujillo y F. Garcia-Ochoa (2012). Phenomenological kinetic modelling of the esterification of rosin and polyols. *Chemical Engineering Journal* **197**: 387-397.
- Lamers, P., C. Hamelinck, M. Junginger y A. Faaij (2011). International bioenergy trade - A review of past developments in the liquid biofuel market. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15** (6): 2655-2676.
- Larissegger-Schnell, B., S. M. Glueck, W. Kroutil y K. Faber (2006). Enantio-complementary deracemization of ( $\pm$ )-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and ( $\pm$ )-3-phenyllactic acid using lipase-catalyzed kinetic resolution combined with biocatalytic racemization. *Tetrahedron: Asymmetry* **62** (12): 2912-2916.
- Laszlo, J. y K. Evans (2009). Influence of cosolvents on the hydrophobic surface immobilization topography of *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **58**: 169-174.
- Len, C. y R. Luque (2014). Continuous flow transformations of glycerol to valuable products: an overview. *Sustainable Chemical Processes* **2** (1): 1.
- Lencki, R. W., J. Arul y R. J. Neufeld (1992). Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation, and decomposition on enzyme

- inactivation kinetics: I. First-order behaviour. *Biotechnology and bioengineering* **40** (11): 1421-1426.
- Luna, C., C. Verdugo, E. De Sancho, D. Luna, J. Calero, A. Posadillo, F. Bautista y A. Romero (2014). Production of a biodiesel-like biofuel without glycerol generation, by using Novozym 435, an immobilized *Candida antarctica* lipase *Bioresources and Bioprocessing* **1** (11): 1-13.
- McGettigan, P. y D. Henry (2013). Use of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs that elevate Cardiovascular risk: An examination of sales and essential medicines list in low-middle-, and high- income countries. *Plos Medicine* **10** (2): 1-6.
- Michiyo, I. (1988). Positionally non-specific lipase from *Candida sp.* a method for producing it, its use and a recombinant DNA process for producing it. *Google Patents*. **WO 1988002775 A1**: 205-259.
- Mirowska, A., A. Kubiak, T. Antczak y S. Bielecki (2009). Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process *Renewable Energy* **34**: 1185-1194.
- Modi, J. D. y J. K. Patel (2011). Nanoemulsion-based gel formulation of aceclofenac for topical delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research* **1** (1): 6-12.
- Mohan, R. y C. Ramaa (2007). Ester prodrugs of flurbiprofen: Synthesis, plasma hydrolysis and gastrointestinal toxicity Indian Journal of Chemistry. **46B**: July.1164-1168. *Indian Journal of Chemistry* **46B**: 1164-1168.
- Molinero, L., M. Ladero, J. Tamayo, J. Esteban y F. Garcia-Ochoa (2013). Thermal esterification of cinnamic and p-methoxycinnamic acids with glycerol to cinnamate glycerides in solventless media: A kinetic model. *Chemical Engineering Journal* **225**: 710-719.
- Molinero, L., M. Ladero, J. Tamayo y F. Garcia-Ochoa (2014). Homogeneous catalytic esterification of glycerol with cinnamic an methoxycinnamic acids to cinnamate glycerides in solventless medium: Kinetic modeling. *Chemical Engineering Journal* **247**: 174-182.
- Morrone, R., N. D'Antona, D. Lambusta y G. Nicolosi (2010). Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65** (1-4): 49-51.
- Morrone, R., G. Nicolosi, A. Patti y M. Piattelli (1995). Resolution of racemic flurbiprofen by lipase-mediated esterification in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (7): 1773-1778.
- Németh, Á. y B. Sevela (2008). Development of a New Bioprocess for Production of 1,3-propanediol I.: Modeling of Glycerol Bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **144** (1): 47-58.
- Nerurkar, J., J. Beach, M. Park y H. Jun (2005). Solubility of (±)-ibuprofen and S(+)-ibuprofen in the presence of cosolvents and cyclodextrins. *Pharmaceutical Development and Technology* **10**: 413-421.
- Norhasyimi, R., A. Ahmad Zuhairi y M. Abdul Rahman (2010). Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14** (3): 987-1000
- Ogliaruso, M. y J. Wolfe (2010). The synthesis of carboxylic acids and esters and their derivatives, in Acid Derivatives. . *Jerusalem, The Hebrew University*.



- Ollis, D., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. Franken, M. Harel, S. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. Sussman, K. Verseheuren y A. Goldman (1992). The alpha/beta-hydrolase fold *Protein Engineering* **5**: 197-211.
- Ong, A. L., A. H. Kamaruddin, S. Bhatia, W. S. Long, S. T. Lim y R. Kumari (2006). Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology* **39** (4): 924-929.
- Pagliaro, M., R. Ciriminna, H. Kimura, M. Rossi y C. Della Pina (2007). From Glycerol to Value-Added Products. *Angewandte Chemie International Edition* **46** (24): 4434-4440.
- Pagliaro, M. y M. Rossi (2008a). The future of glycerol. *Focus on Catalysts* **2008** (6): 8-8.
- Pagliaro, M. y M. Rossi (2008b). The future of glycerol: New uses of a versatile raw material. *RSC Green Chemistry Book Series, RSC Publishing, Cambridge*.
- Pagliaro, M. y M. Rossi (2010). The future of glycerol. Royal Society of Chemistry.
- Perez, I. (2006). Acilaciones regioselectivas de oligosacáridos catalizadas por enzimas: caracterización y propiedades de los productos. Tesis Doctoral (2006). *Tesis Doctoral, Universidad de Granada*.
- Perlovich, G., S. v. Kurkov, L. Hansen y A. Bauer-Brandl (2004). Thermodynamics of Sublimation, Crystal Lattice Energies, and Crystal Structures of Racemates and Enantiomers: (b)- and ( )-Ibuprofen. *Journal of Pharmaceutica Sciences* **93** (3).
- Petkar, S. A. y B. Gogte (2008). Novel Sorbitol Resin based Polymeric Surfactant for Liquid Detergent. *Chemical Engineering World* **43** (2): 84-87.
- Philip, G. C. (2012). A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatology International* **32**: 1491-1502.
- Prieto, J. M. (2007). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES). ¿Dónde estamos y hacia donde nos dirigimos? (Primera Parte). *Científica dental* **4** (3): 203-212.
- Qandil, A. M. (2012). Prodrugs of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), More Than Meets the Eye: A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences* **13** (12): 17244-17274.
- Quispe, C., C. Coronado y J. A. Carvalho Jr (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27** (0): 475-493.
- Rao, P. y E. E. Knaus (2008). Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition beyond. *Journal Pharmaceutical Sciences* **11** (2): 81-110.
- Reis, P., K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser y R. Miller (2009). Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* **147-148** (0): 237-250.
- Rodrigues, R. y R. Fernandez (2010). Lipase from *Rhizomucor miehe* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **64**: 1-22.
- Saxena, R. K., P. Anand, S. Saran y J. Isar (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* **27** (6): 895-913.
- Schmid, R. y V. R (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications *Angewandte Chemie International Edition* **37**: 1608-1633.
- Secundo, F. y G. Carrea (2002). Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **19-20** (0): 93-102.

- Shang, C.-S. y C.-S. Hsu (2003). Lipase-catalized enantioselective esterification of (S)-naproxen hydroxyalkyl ester in organic media *Biotechnology Letters*. 25: 413-416. *Biotechnology Letters* **25** (413-416.).
- Sharma, S. y S. S. Kanwar (2014). Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *The Scientific World Journal* **2014**.
- Soltes, E. J. y D. F. Zinkel (1989). Chemistry of rosin, in: D.F. Zinkel, J. Russell (Eds.), *Naval 4. Conclusions Stores: Production, Chemistry, and Utilization*, Pulp Chemical Association, New York.
- Sun, J., Y. Jiang, L. Zhou y J. Gao (2010). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New Biotechnology* **27** (1): 53-58.
- Tamayo, J. (2014). Producción enzimática de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácido benzoico y  $\alpha$ -metoxicinámico. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Tamayo, J. J., M. Ladero, V. E. Santos y F. Garcia-Ochoa (2012). Esterification of benzoic acid and glycerol to alpha-monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry* **47** (2): 243-250.
- Tan, H., A. A. Aziz y M. Aroua (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**: 118-127.
- Testa, B. (2009). Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Current Opinion in Chemical Biology* **13** (3): 338-344.
- Tischer, W. y V. Kasche (1999). Immobilized enzymes: crystals or carriers? . *Trends in Biotechnology* **17** (8): 326-335.
- Torres y Carrera (2010). Informe Biocombustibles 2010. *Torres y Carrera consultores de comunicación*. <http://www.torresycarrera.com/>.
- Turner, N. y E. Vulson (2000). At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme and Microbial Technology* **27**: 108-113.
- U.S. Soybean Export Council (2007). Glycerin Market Analysis. Indianapolis, *ABG*.
- Uppenberg, J., S. Patkar, T. Bergfors y T. A. Jones (1994). Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Biology* **235** (2): 790-792.
- Urtiaga, A., E. D. Gorri y C. Casado (2003). Pervaporative Dehydration of Industrial Solvents Using a Zeolite NaO Commercial Membrane. *Separation and Purification Technology* **32**: 207-213.
- Wang, S. (2007). Synthesis of light-colored Rosin Glycerol Ester. . *Holzforschung* **61** (5): 499-503.
- Wolfson, A., C. Dlugy y Y. Shotland (2007). Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environmental Chemistry Letters* **5** (2): 67-71.
- Won, K., J. Hong, K. Kim y S. Moon (2006). Lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation. *Process Biochemistry* **41** 264-269.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2010). Lipase-catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach. *Process Biochemistry* **45** (4): 586-592.
- Yahya, A. R. M., W. A. Anderson y M. Moo-Young (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology* **23** (7-8): 438-450.
- Ying, M., L. Miller, W. Gao y R. Gross (2003). Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy. *Biomacromolecules* **4**: 70-74.

- Zaghloul, A., F. Abd-Allah, H. A. Seada y A. Nada (2013). Stability and Human Bioavailability of Optimized Self-Emulsified Drug Delivery System of Ibuprofen. *American Journal of Pharmtech Research* **3** (3): 720-733.
- Zhao, X.-G., D.-Z. Wei y Q.-X. Song (2005). A facile enzymatic process for the preparation of ibuprofen ester prodrug in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **36** (1–6): 47-53.
- Zhao, X., X. Tao, D. Wei y Q. Song (2006). Pharmacological activity and hydrolysis behavior of novel ibuprofen glucopyranoside conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41** (11): 1352-1358.
- Zhou, C. H., J. N. Beltramini, Y. X. Fan y G. Q. Lu (2008). Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Review* **37** (3): 527-549.

---

*Capítulo 2*  
**MATERIALES y MÉTODOS**

---

## **2.- MATERIALES y MÉTODOS**

### **2.1.- EQUIPOS**

#### **2.1.1.- Equipo para la medida de solubilidades**

En la determinación de la solubilidad de la mezcla ibuprofeno-glicerina e ibuprofeno-tolueno-glicerina se ha utilizado el equipo de Resonancia Magnética Nuclear de la Figura 2.1, marca Bruker Avance 300 MHz del C.A.I. de Resonancia Magnética Nuclear y de Spin Electrónico de la Universidad Complutense de Madrid. El equipo consta de un imán que genera el campo magnético requerido para inducir transiciones de RMN. Para mantener un sistema superconductor, el núcleo magnético se enfría a temperaturas muy bajas utilizando nitrógeno líquido y helio (300 Ultrashield). La consola Avance 300 se encarga de llevar a cabo la adquisición de datos, la cual se encuentra conectado a un ordenador que ejecuta el programa Topspin y se ocupa de todos los análisis y almacenamiento de datos.

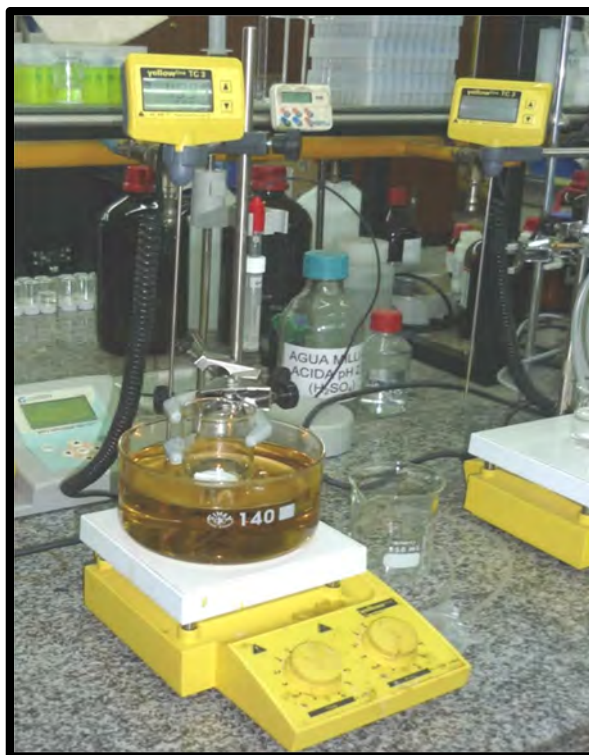


**Figura 2.1.** Resonancia Magnética Nuclear

### **2.1.2.- Equipo para el estudio de la reacción de esterificación**

En los experimentos de esterificación de glicerina con ibuprofeno se utilizó una instalación experimental diseñada al efecto, Figura 2.2, que consiste de un pequeño reactor discontinuo isoterma agitado magnéticamente conformado por:

- Vaso de cristal con fondo redondeado sumergido en un baño de glicerina.
- Agitación con disco de teflón. La velocidad de agitación se puede regular y mantener controlada en el valor objetivo. (IKA Yellow Line, modelo MSC basic C).
- La temperatura es medida y controlada por un termopar acoplado a un controlador PID de temperatura (IKA, modelo TC3).

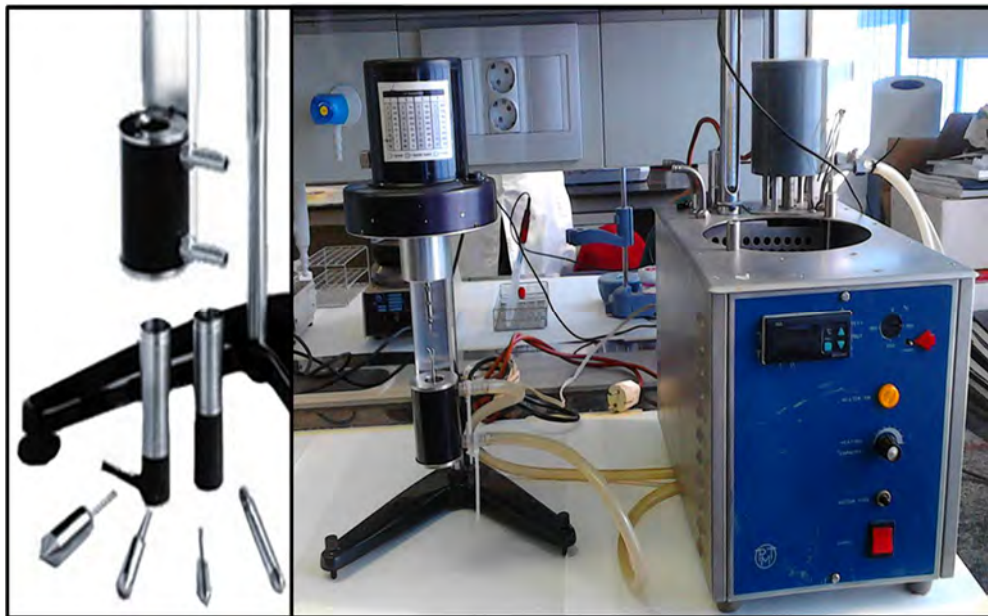


**Figura 2.2.** Instalación experimental para reacciones de esterificación

### **2.1.3.- Equipo para la medida de viscosidad**

En la determinación de la viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno y glicerina-tolueno-agua se ha utilizado un viscosímetro de cilindros concéntricos de la Figura 2.3, marca Brookfield LVT. El equipo consta de: motor eléctrico, un dial de lectura, botón giratorio de velocidad en el intervalo de 1,5 a 60 rpm, botón para bloquear la aguja del

dial, vaso cilíndrico, vástago intercambiable “spindle”, chaqueta de calentamiento conectada a un baño termostático.



**Figura 2.3.** Viscosímetro concéntrico marca Brookfield

#### **2.1.4.- Equipo de Análisis**

##### ***Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)***

El equipo utilizado es un HPLC de la marca JASCO (serie LC-2000) que se muestra en la Figura 2.4. Consta de los siguientes elementos, conectados secuencialmente según el siguiente orden:

- Bomba de gradiente de baja presión de cuatro vías con desgasificación por vacío de eluyentes, de referencia Jasco modelo PU – 2089.
- Automuestreador: en este elemento de 120 posiciones robotizado y refrigerado, de referencia AS modelo 2059 de la firma comercial Jasco, se introducen los viales que contienen las muestras a analizar.
- Termostato Jasco CO – 2065 para alojar la columna y mantener una temperatura determinada.
- Detector de diode array modelo Jasco MD 2015 para detección por absorción en el espectro ultravioleta-visible.





**Figura 2.4.** Cromatógrafo HPLC marca Jasco

### ***Cromatografía líquida-Espectrómetro de Masas***

Para identificar el producto formado durante la esterificación enzimática de la glicerina con ibuprofeno, se ha utilizado el equipo Espectrómetro de Masas LCMS-8030 Shimadzu (Figura 2.5). El LCMS-8030 es un detector universal para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos, el haz de iones produce un patrón específico en el detector que permite analizar el compuesto. Este estudio se ha realizado en el C.A.I. de Espectrometría de Masas de la Universidad Complutense de Madrid.





**Figura 2.5.** Cromatógrafo líquida-Espectrómetro de masas

### *Distribución de tamaños de gota*

En la determinación del tamaño de la gota de la mezcla ibuprofeno-glicerina-enzima CALB en su forma libre, se han utilizado una serie de equipos para caracterizar el tamaño de la gota de la suspensión-emulsión formada. Para la caracterización de las gotas de mayor tamaño, se utilizó el Nanophotometer P-330 (Figura 2.6) determinando la turbidez de la mezcla. Este equipo está formado por una lámpara de xenón, midiendo en un rango de 190-1100 nm de longitud de onda. También, fue empleado el equipo FBRM Lasentec M500LF de Mettler (Figura 2.7), para determinar la distribución de los tamaños de gota de mayor tamaño. Este es un sistema de medida por reflexión de rayo enfocado. Este consta de un sensor capaz de generar un haz de luz láser ( $\lambda=791$  nm) y detector conectado al sistema informático que permite obtener la data de la distribución del tamaño de la gota de la muestra en cuestión.



**Figura 2.6.** Equipo de turbidimetría Nanophotometer 300



**Figura 2.7.** Equipo de FBRM Lasentec M500LF de Mettler

Por otra parte, para determinar la distribución del tamaño de gotas de menor tamaño de la mezcla ibuprofeno-glicerina-enzima CALB en su forma libre, fue utilizado el equipo Nanobrook 90 plus Zeta (Figura 2.8). Las especificaciones del equipo son: Diode laser 35 mW a una longitud de onda 640 nm, celda plástica, el rango de medida de 2 nm hasta 6  $\mu\text{m}$ , controlador de temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta  $100^{\circ}\text{C}$ , ángulo de dispersión a  $90^{\circ}$ . La distribución del tamaño de la gota se mide por dispersión de la luz dinámica (DLS en inglés).



**Figura 2.8.** Equipo de NanoBrook 90Plus Zeta

***Superficie específica y tamaño de poros para el soporte de la enzima inmovilizada***

Para determinar el área superficial y el tamaño de poros, tanto del soporte Lewatit VP OC 1600 como del inmovilizado Novozym 435, se ha utilizado el analizador de adsorción de gas, Coulter serie SA 3100 (Figura 2.9). El equipo consta de un sistema integrado de desgasificación, bomba de vacío y colector. Permite medir la presión de saturación de forma continua, tiene un volumen de colector mínima para aumentar la sensibilidad, y lleva a cabo una medición de espacio libre de helio multipunto, para mejorar la repetibilidad y precisión. El programa informático permite determinar los moles de nitrógeno (N<sub>2</sub>) adsorbidos (basado en la masa de la muestra entrada, el volumen del colector y el volumen de vacío del tubo de ensayo).



**Figura 2.9.** Equipo de Coulter SA 3100

***Microscopía electrónica de barrido (SEM)***

La morfología superficial de las partículas del soporte Lewatit VP OC 1600 y de la enzima inmovilizada Novozym 435 y una estimación del tamaño de partícula medio se obtuvo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un aparato JEOL 6400 JSM (Figura 2.10). El equipo consta de una unidad óptica electrónica (cañón) que genera el haz de electrones que pasan a través del lente condensador y deflectores de electrones. Un generador de barrido donde se barre la superficie con electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector formado por lentes basadas en electroimanes, mide la

cantidad e intensidad de electrones que devuelve la muestra, este detector está conectado al sistema informático permite obtener la imagen de la muestra.



**Figura 2.10.** Equipo de microscopía de barrido SEM

### 2.1.5.- Equipos auxiliares

Para la precipitación del ibuprofeno a partir de su sal sódica se emplearon los siguientes equipos que se presentan en la Tabla 2.1

**Tabla 2.1.** Equipos auxiliares usados en experimentación

EQUIPO		
		
Balanza Kern	pH metro Butech pH 700	Mezclador y calentador Eppendorf Thermomixer comfort

## 2.2.- MATERIALES

En la experimentación de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno fueron empleados los materiales que se muestran en la Tabla 2.2 donde se especifica la marca y el grado de pureza de cada uno.

**Tabla 2.2.** Materiales empleados durante la experimentación

COMPUESTO	PUREZA	MARCA
Ibuprofeno sódico	99,9%	Sigma Aldrich
Agua Mili-Q		
Tetradecano	99%	Sigma Aldrich
Terbutil	99 %	Alfa Aesar
2-Butanona	99,7%, HPLC	Sigma Aldrich
Tolueno	99%	Panreac
Dimetileter	99%	Panreac
Dioxano	99%	Alfa Aesar
T-pentanol	99%,DC	Sigma Aldrich
Dibutil.eter	99%	Sigma Aldrich
Glicerina	99%	SharlauChemie
Metanol	Grado HPLC	Sigma Aldrich
Ácido Clorhídrico	35% p/p	Panreac
Lewatit VP OC 1600		Lanxess

### 2.2.1.- Enzimas Lipasas

Por otro lado, se emplearon dos enzimas lipasas industriales, la enzima en su estado libre Lipozyme de *Candida antarctica* lipasa B (CALB-L) y la enzima inmovilizada Novozym 435 de *C. antarctica* lipasa B, amablemente donadas por Novozymes A/S; en la Tabla 2.3 se presentan las características de estas dos enzimas. La composición típica de la preparación enzimática de CALB-L, contiene principalmente:

- Proteína: 4% en peso.
- Estabilizadores enzimáticos: Glicerina (25%), sorbitol (25%).
- Agua (40%).
- Aditivos: Benzoato de sodio (0.2%) y sorbato de potasio (0.1%).

**Tabla 2.3.** Características de las enzimas lipasas utilizadas (www.novozymes.com)

	<b>Lipozyme CALB</b>	<b>Novozym 435</b>
<b>Fuente</b>	<i>Candida antarctica</i>	<i>Candida antarctica</i>
<b>Microorganismo huésped</b>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Actividad</b>	5000 LU/g*	10000 PLU/g**
<b>pH óptimo</b>	5-9	5-9
<b>Temperatura óptima</b>	30-60 °C	30-60 °C
<b>Peso molecular</b>	33 kDa	33 kDa
<b>Especificidad de sustrato</b>	Ésteres y alcoholes	Ésteres y alcoholes
<b>Estado físico</b>	Líquido marrón claro	Granulado inmovilizado color crema

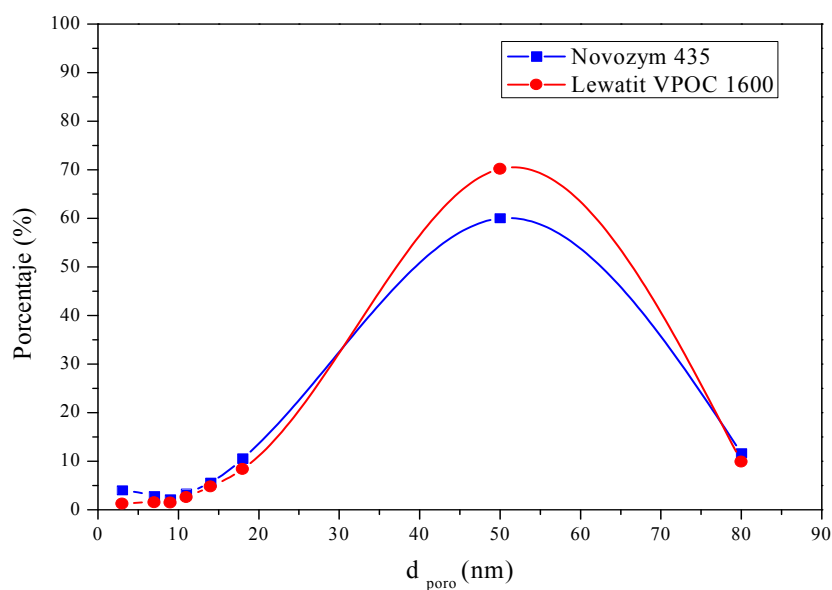
\*1 LU (unidad de lipasa) es la cantidad de actividad de la enzima cuando se libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico valorable por minuto

\*\*PLU (unidad propillaureato) es la cantidad de actividad de la enzima cuando se genera 1  $\mu\text{mol}$  de propillaureato por minuto

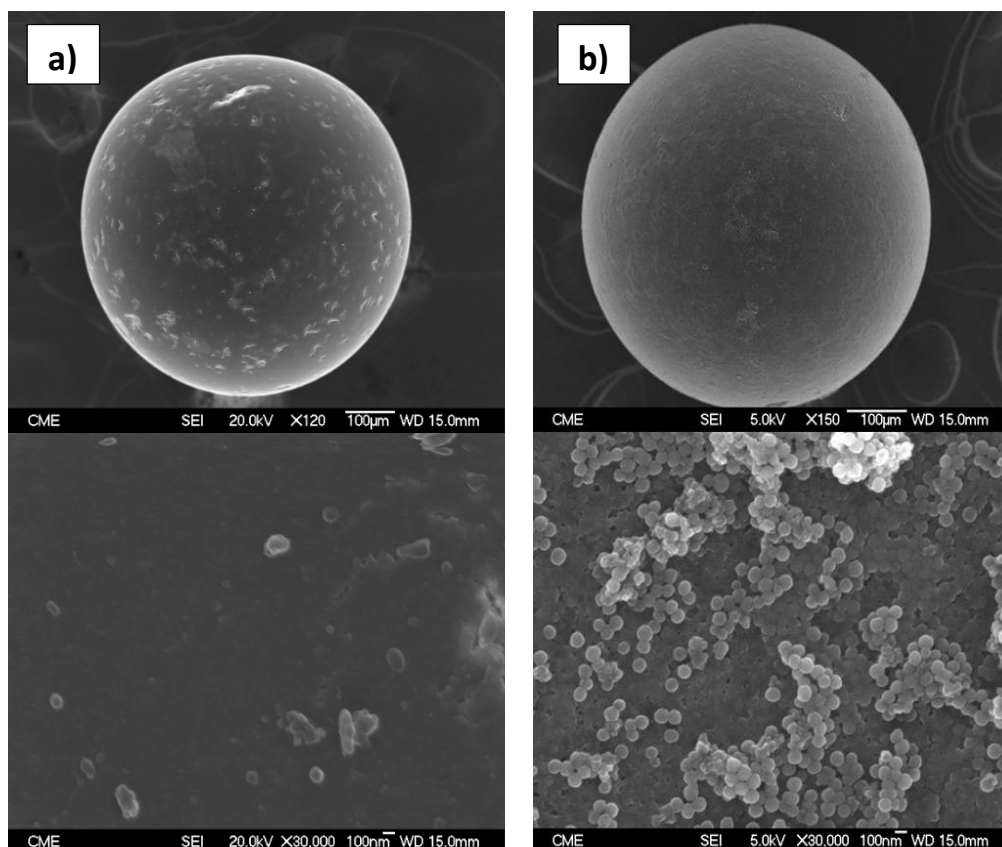
El inmovilizado Novozym 435 es preparado por interacción hidrofóbica múltiple, sobre una resina macroporosa de intercambio iónico Lewatit VP OC 1600 (Chen y col., 2008; Mei y col., 2003). En la Tabla 2.4 se presenta la composición del preparado inmovilizado, además de las características de superficie específica y volumen de poro, tanto del soporte como de la enzima inmovilizada. La superficie específica fue determinada por el método BET y el volumen del poro por el método BHJ, ambos descritos en el apartado 2.4.5. En Figura 2.11 se muestra la distribución del tamaño del poro en la partícula de soporte y de la Novozym 435. La Figura 2.12 presenta la comparación de las micrografías SEM del soporte Lewatit VP OC 1600 y de la enzima Novozym 435.

**Tabla 2.4.** Composición y características de enzima inmovilizada Novozym 435

Composición	Valor
Proteína enzimática activa (AEP)	10-20
Porcentaje en peso (%)	20-30
Contenido de agua (%)	1-2
Densidad (g/mL)	0.40
Característica	Valor
Soporte: Lewatit VP OC 1600	
Superficie específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	81.9
Volumen total de poro (mL g <sup>-1</sup> )	0.49
Novozym 435	
Superficie específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	70.3
Volumen total de poro (mL g <sup>-1</sup> )	0.30



**Figura 2.11.** Distribución de tamaño de poro partícula del soporte Lewatit VP PC 1600 y Novozym 435



**Figura 2.12.** Microscopia SEM: a) Novozym 435 a 120 y 30000 aumento, y b) Lewatit VPOC 1600 a 150 y 30000 aumentos

### 2.2.2.- Obtención de ibuprofeno por precipitación

El ibuprofeno se obtuvo a partir de la precipitación de la sal sódica de ibuprofeno ( $C_{13}H_{17}O_2Na$ ) con una disolución de ácido clorhídrico [0,10 M], procediendo de la siguiente manera:

- Se pesan 12 g de la sal sódica ibuprofeno y se disuelven en 200 mL de agua mili-Q, agitándose hasta disolver completamente la sal sódica.
- Se mide el pH de esta disolución (previamente calibrado el pHmetro con la solución buffer de pH=4,7 y 10), después se añade poco a poco la disolución de HCl [0,10 M] hasta alcanzar un pH entre 1 y 3.
- Se filtra al vacío, lavándose varias veces con agua mili-Q y se deja secar el precipitado a temperatura ambiente, obteniendo de esta manera el ibuprofeno empleado en la reacción de esterificación y en la prueba de solubilidades.



## 2.3.- MÉTODOS

### 2.3.1.- Determinación de solubilidad del ibuprofeno

La solubilidad del ibuprofeno fue determinada en diferentes disolventes y así elegir el más adecuado. En un vial de 1.5 mL se pesaba aproximadamente 50 mg de ibuprofeno, se añadía gota a gota el disolvente con una micropipeta, se colocaba en el equipo Thermomixer descrito en el apartado 2.1.8, se agitaba a 720 rpm para disolver el ibuprofeno a la temperatura ambiente.

La solubilidad de ibuprofeno en la glicerina fue determinada variando la concentración inicial de ibuprofeno; se utilizaron los siguientes valores de concentración 20, 60 y 100 g·L<sup>-1</sup>, la temperatura se varió entre 50 y 80 °C. La cantidad deseada de ibuprofeno fue añadida a 20 mL de glicerina pura y colocada en la instalación de Figura 2.1. La mezcla fue agitada durante 24 h a 720 rpm. Después de este tiempo, 1 mL de la mezcla fue filtrada a través de un filtro de 0.22 µm y 10 µL; a continuación se diluía con DMSO-d<sub>6</sub>; la concentración de ibuprofeno se determinó por espectroscopia de resonancia magnética de protón (<sup>1</sup>H NMR) a desplazamientos químicos de δ=0.85 ppm y δ=4.4 ppm, para ibuprofeno y glicerina, respectivamente. De igual manera, fue determinada la solubilidad del ibuprofeno en tolueno. Para ello, una cierta cantidad de ibuprofeno fue añadida a 2.5 mL de tolueno y colocado en la instalación descrita en el apartado 2.1.2, bajo las condiciones antes mencionadas de temperatura; la concentración de tolueno se determinó también por <sup>1</sup>H NMR a desplazamiento de δ=2.32 ppm.

Por otra parte, se determinó la relación de partición de ibuprofeno en la mezcla ibuprofeno-glicerina-tolueno de la siguiente manera: se pesaron 2.5 g de ibuprofeno (C<sub>10</sub>=100 g·L<sup>-1</sup>) en un micro-reactor, se añadió 5 mL de tolueno y 20 mL de glicerina. Se colocó en la instalación descrita en el apartado 2.1.2, variando la temperatura de 50 hasta 80 °C y agitando a 720 rpm por 24 h. Después de este tiempo, la mezcla se transvasó a un embudo de decantación para separar las fases glicerina y tolueno. La concentración de cada fase se determinó por espectroscopia de resonancia magnética de protón (<sup>1</sup>H NMR) siguiendo el procedimiento de preparación de la muestra descrito en el párrafo anterior. La relación de partición del ibuprofeno entre la fase de glicerina y tolueno fue calculada usando la ecuación siguiente:

$$K_p = \frac{\left(\frac{\text{mol l}}{V_{\text{Tol}}}\right)_1}{\left(\frac{\text{mol l}}{V_{\text{Gly}}}\right)_2} \quad [2.1]$$

### **2.3.2.- Desarrollo de un experimento de esterificación**

Los experimentos de síntesis de éster de ibuprofeno se llevaron a cabo en la instalación descrita en el apartado 2.1.2, de acuerdo al siguiente método experimental:

- a) Se pesa en la balanza de precisión el ibuprofeno, la cantidad adecuada pesada será aquella que sirva para obtener una solución compuesta por 20 mL de glicerina pura y el ibuprofeno suficiente para que su concentración este dentro del intervalo 20-100 g·L<sup>-1</sup>.
- b) Se lleva a un baño de glicerina el reactor con la cantidad de ibuprofeno y 20 mL de glicerina pura, que mantiene la temperatura constante y controlada (50-80 °C), agitando para su disolución. Una vez alcanzada la mezcla homogénea se toma una primera muestra (0,25 mL) en ausencia de enzima, considerada como la muestra a tiempo cero.
- c) Se da inicio a la reacción por adición del derivado enzimático que se utiliza en cada experimento. La concentración de catalizador fue siempre igual, en torno a 30 g de enzima por litro de glicerina.
- d) Las muestras tomadas (0,25 mL) a lo largo de la transformación se congelan, con la finalidad de parar la acción de la enzima.
- e) Terminada la reacción, el contenido del reactor se vierte en el contenedor adecuado para su posterior tratamiento y se procede a la limpieza de la instalación.

### **2.3.3.- Determinación de la viscosidad de mezcla**

La viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno y glicerina-tolueno-agua se determinó usando el equipo descrito en el apartado 2.1.3, siguiendo el procedimiento que se describe:

- a) Preparar las mezcla de glicerina-tolueno (20:5) en volumen y glicerina-tolueno-agua (20:5:2) en volumen.

- b) Llenar el vaso cilíndrico con la mezcla preparada evitando no producir burbujas de aire y no se debe cargar demasiado para evitar que el fluido se derrame al sumergir el vástago.
- c) Colocar el vaso cilíndrico en la chaqueta de calentamiento e introducir el vástago.
- d) Encender el baño termostático a la temperatura de operación, intervalo entre 50 a 80 °C. Esperar que se equilibren la temperatura del baño y la chaqueta.
- e) Poner el motor en marcha y ajustar la velocidad de giro en el intervalo de 1,5 a 60 rpm. A una velocidad de giro fijo, se deja que la aguja gire sobre el dial, pasado unos segundos para que se estabilice se bloquea la aguja y se toma la lectura. Después, volver a poner en marcha el motor y tomar otra lectura. Se continúa tomando lecturas hasta que 2 valores consecutivos no difieran en  $\pm 3 \%$ . Tomar el valor medio de las dos últimas lecturas.
- f) A diferentes valores de velocidad de giro, se obtiene una par de torsión, con este valor y la velocidad de giro se determinan la tensión tangencial (ecuación y la velocidad de deformación (ecuación

$$\tau_v = \frac{F_T}{2 \cdot \pi \cdot R_v^2 \cdot L} \quad [2.2]$$

$$\gamma_v = \frac{\omega \cdot R_1}{\delta_v} \quad [2.3]$$

$$\omega = N \cdot \frac{2 \cdot \pi}{60} \quad [2.4]$$

donde:  $F_T$  par de torsión aplicado (N. m);  $\tau_v$  tensión tangencial (N. m<sup>2</sup>);  $\omega$  velocidad angular (rad s<sup>-1</sup>);  $\gamma_v$  velocidad de deformación (s<sup>-1</sup>); N= velocidad de giro (rpm). Datos del viscosímetro:  $R_v = 8,5$  mm,  $L = 5$  cm y  $\delta_v = 1$  mm

- g) Graficar tensión tangencial ( $\tau_v$ ) *versus* velocidad de deformación ( $\gamma$ ), determinar la pendiente de la curva, para un fluido newtoniano la pendiente es la viscosidad del fluido.

#### **2.3.4.- Caracterización de la suspensión-emulsión**

Para la medida por turbidimetría, en viales de 2mL, se tomaron muestras de los experimentos de esterificación de glicerina con ibuprofeno a distintas concentraciones y temperaturas. Estas fueron analizadas sin dilución cambiando la temperatura de la celda del equipo y a una longitud de onda de 600 nm. Para analizar la evolución del tamaño de la partícula usando el FBRM se realizó la reacción de esterificación de glicerina y el

ibuprofeno con una concentración inicial de ibuprofeno de  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y variando la temperatura en el intervalo elegido de operación, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.2 hasta el ítem d. Se coloca la probeta del FBRM dentro del reactor hasta una altura donde no choque con el agitador magnético, de esta manera se mide la distribución de longitudes de la cuerda de las partículas hasta un tiempo donde no hubo variaciones significativas en la distribución.

En el análisis por DLS, las muestras tienen que estar diluidas, el disolvente usado fue glicerina, pero antes de diluir las muestras se filtró la glicerina a través de un filtro de  $0.45 \mu\text{m}$ , colocando las muestras en un vial de 5 mL. Para utilizar el software del equipo hay que introducir los parámetros de índice de refracción y viscosidad del disolvente usado en la dilución; la glicerina tiene un índice de refracción de 1.4758 (Hoyt, 1934) y los valores de viscosidad se dan en la Tabla 2.5. Para el análisis de la distribución del tamaño de gotas de la mezcla ibuprofeno-glicerina-enzima, se realizó la reacción de esterificación de glicerina y el ibuprofeno con una concentración inicial de ibuprofeno de  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y variando la temperatura entre  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.2 hasta el ítem d. Las muestras fueron tomadas usando una jeringa de 1 mL, previamente termoestabilizada a la temperatura de operación, luego las muestras son filtradas a través de un filtro de  $0.45 \mu\text{m}$ , y son añadidas algunas gotas en el vial donde está la glicerina filtrada, se mezcla para homogenizarla y se transvasa a la cubeta de plástico del equipo, para su posterior análisis.

**Tabla 2.5.** Valores estimados de glicerina a las condiciones de operación

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Viscosidad 100% glicerina ( $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
50	0.142
60	0.081
70	0.051

### 2.3.5.- Caracterización del soporte de la enzima inmovilizada

#### *Medida de la superficie específica BET*

El análisis de adsorción de nitrógeno es el procedimiento preferido para determinar el área de la superficie de una muestra ya que proporciona una medición directa del área de superficie, siguiendo el procedimiento que se describe:

- Se carga aproximadamente un gramo de una muestra en el tubo del analizador por adsorción de gas Coulter, desgasificándose la muestra a una temperatura de 60 °C y 2 torr de presión, durante treinta minutos.
- Se adsorbe el nitrógeno a una temperatura de 77 K, obteniéndose las curvas de adsorción en la que se define el volumen adsorbido del gas para distintas presiones relativas.
- La superficie específica de una muestra de partículas del soporte y enzima inmovilizada se calculó mediante el método de multicapa BET, descrito en el apartado 2.4.5

#### *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Las muestras se prepararon con grafito por evaporación, fijándose la muestra sobre una probeta de latón utilizando un adhesivo (tratamiento con grafito durante 30 minutos) y se mantuvo a 50 °C y a vacío (20 mmHg) antes de proceder a la observación desde 120 a 30000 aumentos.

## 2.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 2.4.1.- Análisis de las muestras líquidas

#### *Análisis de solubilidad por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

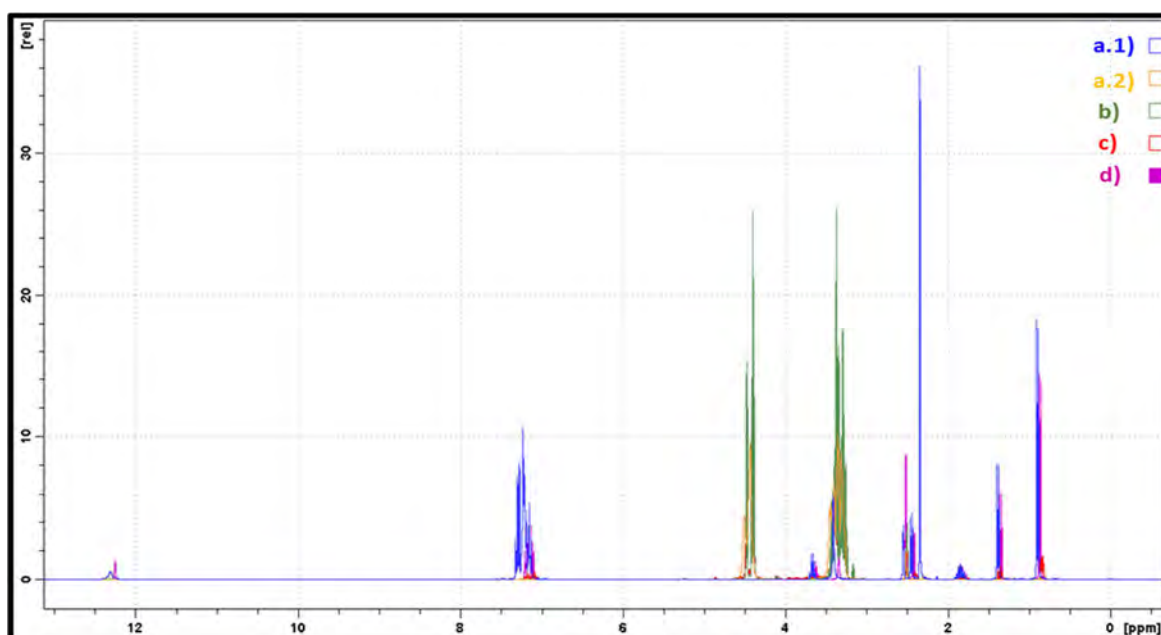
Para determinar la solubilidad del ibuprofeno en glicerina e ibuprofeno en tolueno, así como la mezcla ibuprofeno-tolueno-glicerina, se analizó cada muestra por resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  NMR). El programa *Topspin* permite determinar por integración el área de los números de átomos de hidrógeno que da origen a la señal para cada compuesto, siendo calculada la cantidad de moles por la siguiente ecuación:

$$n_i = \frac{\text{Area } i}{n^\circ \text{ de H}^+} \quad [2.5]$$

En la Tabla 2.6, se muestran la señal de cada compuesto y el número de hidrógenos usados para el cálculo de solubilidades. En la Figura 2.13 se muestran los espectros de resonancia magnética de protón para el ibuprofeno, glicerina, mezcla ibuprofeno-glicerina y mezcla ibuprofeno-tolueno-glicerina.

**Tabla 2.6.** Señal de ibuprofeno, glicerina y tolueno por ( $^1\text{H}$  NMR).

Compuesto	Desplazamientos químicos ( $\delta\text{ppm}$ )	Número de hidrogeno ( $\text{H}^+$ )
Ibuprofeno	0.86	6 $\text{H}^+$
Glicerina	4.4	3 $\text{H}^+$
Tolueno	2.32	3 $\text{H}^+$



**Figura 2.13.** Espectro de  $^1\text{H}$  NMR para: a.1) Fracción Tolueno-Ibuprofeno y a.2) Ibuprofeno-Glicerina de la mezcla ibuprofeno-tolueno-glicerina a  $C_{10}=100\text{ gL}^{-1}$  y  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , b) Glicerina, c) Mezcla ibuprofeno-glicerina a  $C_{10}=100\text{ gL}^{-1}$  y  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y d) Ibuprofeno.

### ***Análisis de la mezcla de reacción por Cromatografía Líquida de Alta Resolución***

La separación de los compuestos de reacción, para el posterior cálculo de sus concentraciones, se ha realizado mediante cromatografía HPLC equipo descrito en el apartado 2.1.3, el cual consta de un sistema de gradiente de baja presión de Jasco de la serie LC-2000 utilizando un detector diode-array (UV-2075), midiendo el porcentaje de área de los diferentes picos a una longitud de onda de 220 nm. Esta técnica tiene como

fundamento la separación de los componentes de la mezcla por la mayor o menor afinidad que tenga una especie con la fase estacionaria de una columna o la fase móvil (eluyente) que esté circulando por el sistema. Las muestras, antes de llegar al automuestreador del HPLC, son diluidas utilizando el siguiente procedimiento:

- a) Se diluye las muestras de 0,25 mL tomadas del micro-reactor, añadiendo 0,75 mL de metanol (99,9 %) a cada muestra y se agitan hasta disolver completamente su contenido. El metanol permite disminuir la densidad para proceder al análisis en el HPLC.
- b) Como es posible que haya partículas en las muestras, con ayuda de una jeringuilla y un microfiltro, se procede a filtrarlas sobre los viales de HPLC; así la filtración ayuda a eliminar las posibles impurezas que pudieran contener las muestras.
- c) Se toma 0,1 mL de las muestras mL y se añade 0,9 mL de metanol, trasvasados en viales de 1 mL.

Una vez colocados los viales en el automuestreador del HPLC, hay que programar el aparato HPLC, la finalidad es encontrar un programa específico para las muestras que se van a analizar y lograr la mejor separación entre los picos, evitando que solapen unos con otros; así se obtendrán respuestas individuales y será más fácil el análisis de los picos. Las condiciones del método empleado se presentan a continuación:

- Fase apolar: Columna “Mediterránea Sea” C-18 de Teknokroma 25x0.46 cm.
- Fase móvil: Mezcla: 83% metanol-17% agua acidificada (los eluyentes utilizados son agua mili-Q acidificada con ácido sulfúrico hasta un pH 2,2 y metanol de elevada pureza).
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Caudal: 0,8 mL/min.

En la Figura 2.14 se presenta un cromatograma tipo correspondiente a una muestra de 30 min, de reacción obtenida de un experimento de esterificación de glicerina e ibuprofeno catalizada con *Cándida antactica* lipasa B en presencia de cosolvente y bajo las condiciones  $C_{10}=60 \text{ g L}^{-1}$ ,  $T=70^{\circ}\text{C}$ . Se puede observar que el primer pico es el monoéster de ibuprofeno ( $t_R=6,9 \text{ min}$ ), el segundo pico corresponde al disolvente ( $t_R=7,6 \text{ min}$ ) y el último pico es el ibuprofeno ( $t_R=8,6 \text{ min}$ ).

Para cuantificar los datos, como referencia se utilizó la suma de las áreas del

ibuprofeno y del monoéster de ibuprofeno, es decir, se asume la misma respuesta para los dos compuestos. Este valor se mantiene siempre constante, debido a que se consideró la semejanza que presentan en su estructura tanto el ibuprofeno y el monoéster de ibuprofeno y, además, se comprobó que existía una evolución de respuesta (espectro) similar, debido a que, tanto en el ibuprofeno como en el monoéster de ibuprofeno, es el anillo aromático el responsable de la respuesta de estos compuestos en el espectro ultravioleta como puede ser observado en la Figura 2.15; en ella se presentan la relación de absorbancia a varias longitudes de onda para el ibuprofeno y monoéster de ibuprofeno. De esta manera, el área de pico de cada compuesto es el valor que se utiliza para calcular su conversión (ecuación [2.6]), considerada como la disminución porcentual del reactivo o sustrato (ibuprofeno).

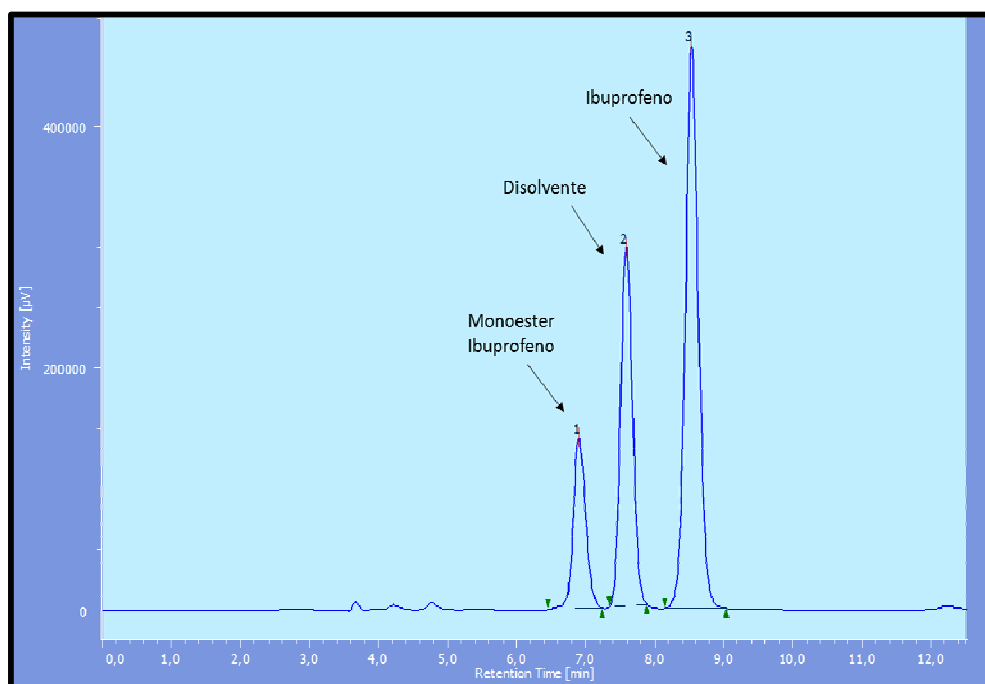
$$X = \frac{\%Area_0 - \%Area_t}{\%Area_0} \quad [2.6]$$

En la Figura 2.16 se muestra la conversión de ibuprofeno ( $X_I$ ) determinada con la ecuación [2.3] y la conversión de monoéster ( $X_{MG}$ ) considerando las sumas de las áreas de ibuprofeno y monoéster; como se puede observar, sus valores se mantiene constante en cada experimento. Por estequiometria, y ante la inexistencia de otros productos, la conversión a monoéster de ibuprofeno se corresponde con la de ibuprofeno en relación uno a uno, y se puede determinar así las concentraciones, como indican las ecuaciones [2.7] y [2.8].

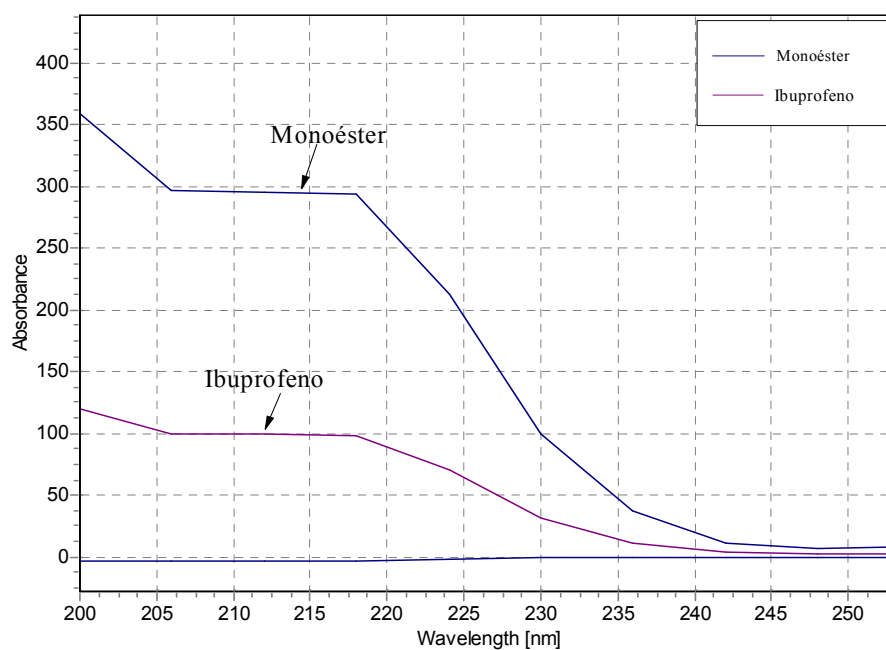
$$C_I = C_{I0} \cdot (1 - X) \quad [2.7]$$

$$C_{MG} = C_{I0} \cdot X \quad [2.8]$$

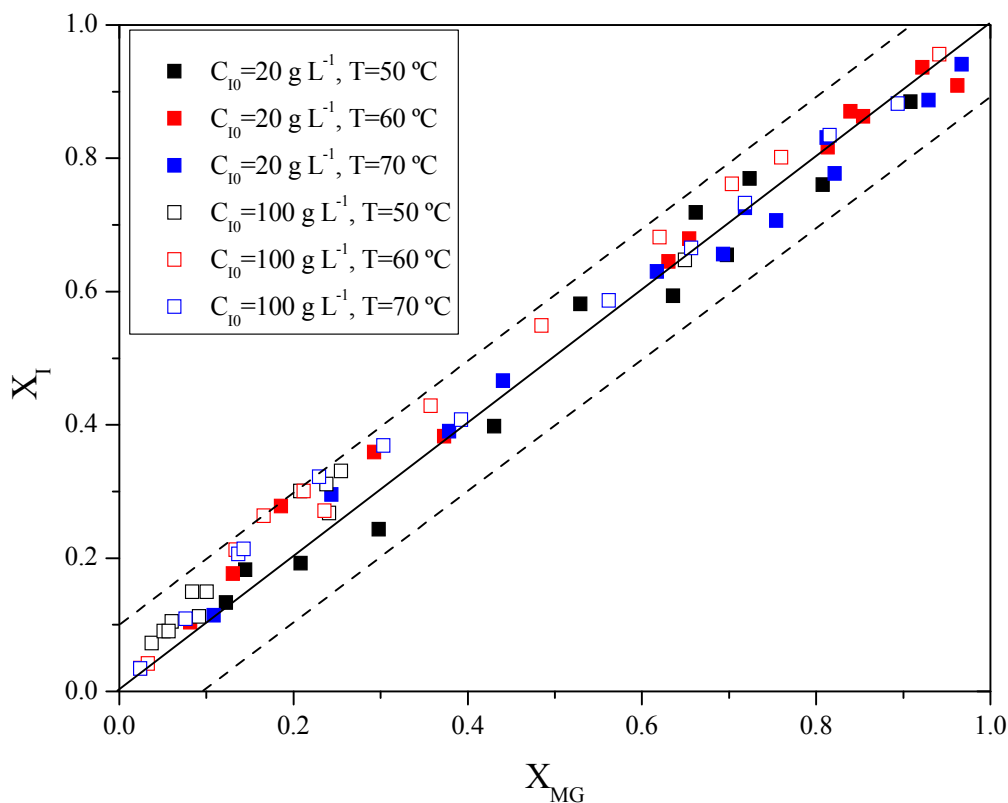




**Figura 2.14.** Cromatograma tipo de la esterificación de glicerina e ibuprofeno catalizada con CALB-L y disolvente. Condiciones:  $C_{10}=60 \text{ g L}^{-1}$ ,  $T=70^{\circ}\text{C}$ ,  $t=30 \text{ min}$



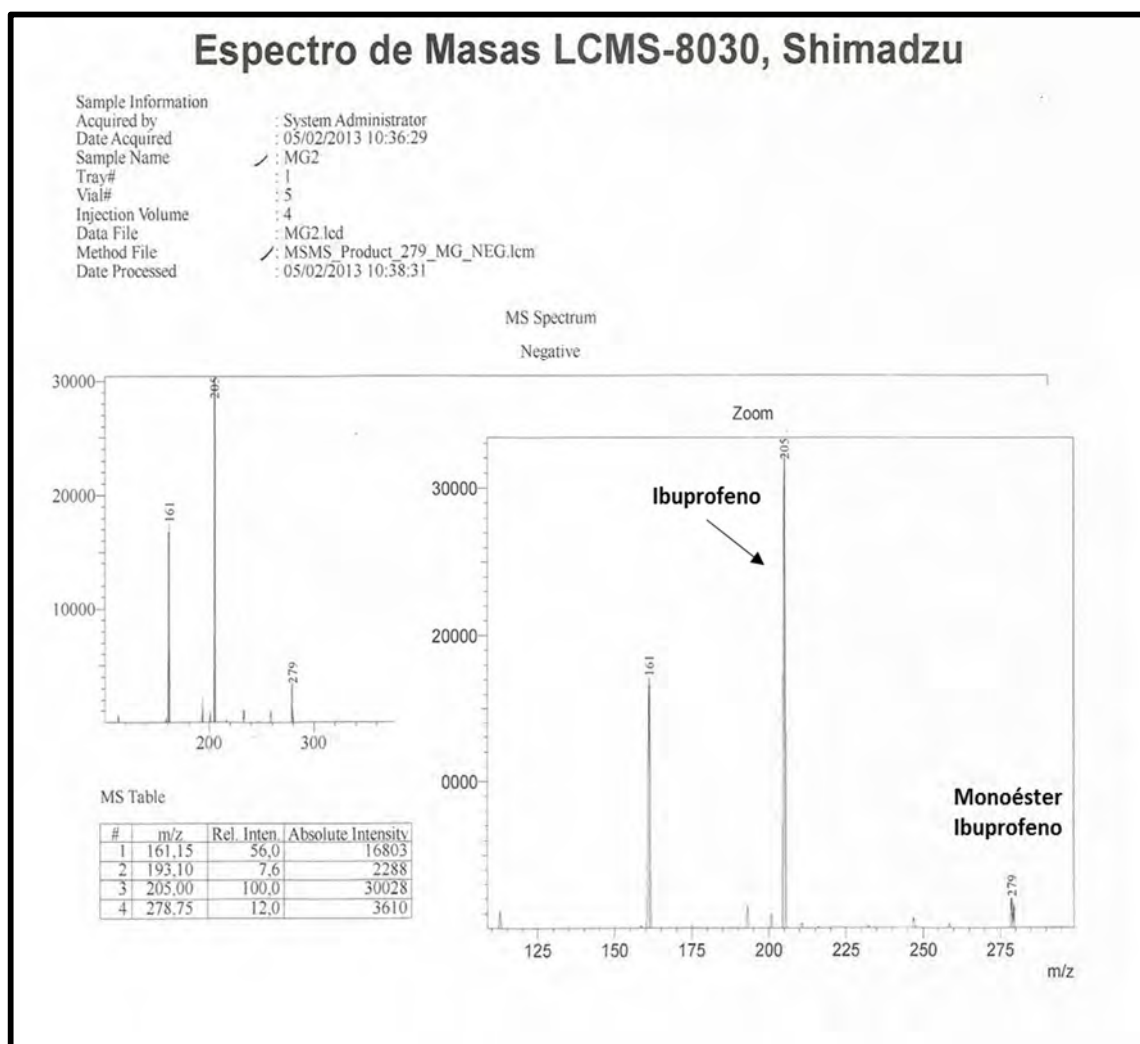
**Figura 2.15.** Absorbancia versus longitud de onda para ibuprofeno y monoéster de ibuprofeno



**Figura 2.16.** Conversión de Ibuprofeno vs Conversión de monoéster

### *Análisis del producto de reacción por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas*

Los espectros de espectrometría de masas se obtienen por ionización tras una separación por cromatografía HPLC del compuesto. El espectro que se muestra en la Figura 2.17 presenta una señal que aparece a  $m/z=205$  referida al ion del ibuprofeno ( $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2^+$ ), otra señal a  $m/z=279$  correspondiente al monoéster de ibuprofeno ( $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_4^+$ ), mientras que la masa del producto esperado es de 280 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ ), lo que se justifica, por la pérdida de un protón en el proceso de ionización electrónica.



**Figura 2.17.** Espectro de masas del ibuprofeno y el monoéster de ibuprofeno

### ***Análisis de la medida de distribución del tamaño de gota***

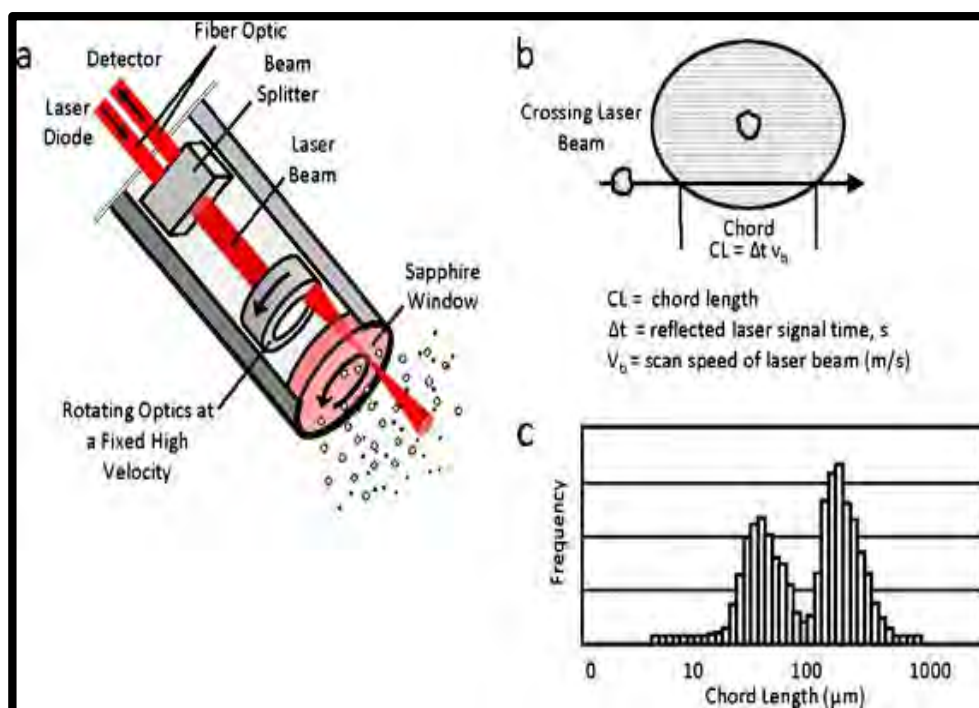
La determinación de la evolución de la distribución del tamaño de gota en la mezcla ibuprofeno-glicerina-enzima, se llevó a cabo mediante del FBRM para las gotas de mayor tamaño (1-1000  $\mu\text{m}$ ). Además, para las gotas de menor tamaño se usó la dispersión de la luz dinámica (DLS en inglés).

FBRM (*focused beam reflectance measurement*) es un sistema de medida por reflexión de rayo enfocado, basada en la medida de cuerdas de partículas y/o agregados de partículas a través de la reflexión de un haz luz láser que barre la muestra con un movimiento circular uniforme a gran velocidad, por ejemplo a 2000 rpm (Blanco y col., 2002). La medida de longitudes de cuerda por reflexión de rayo enfocado es proporcional a la relación entre el índice de refracción de las partículas y el medio de dispersión. Esta técnica ha sido empleada para determinar la distribución de tamaños de partículas en

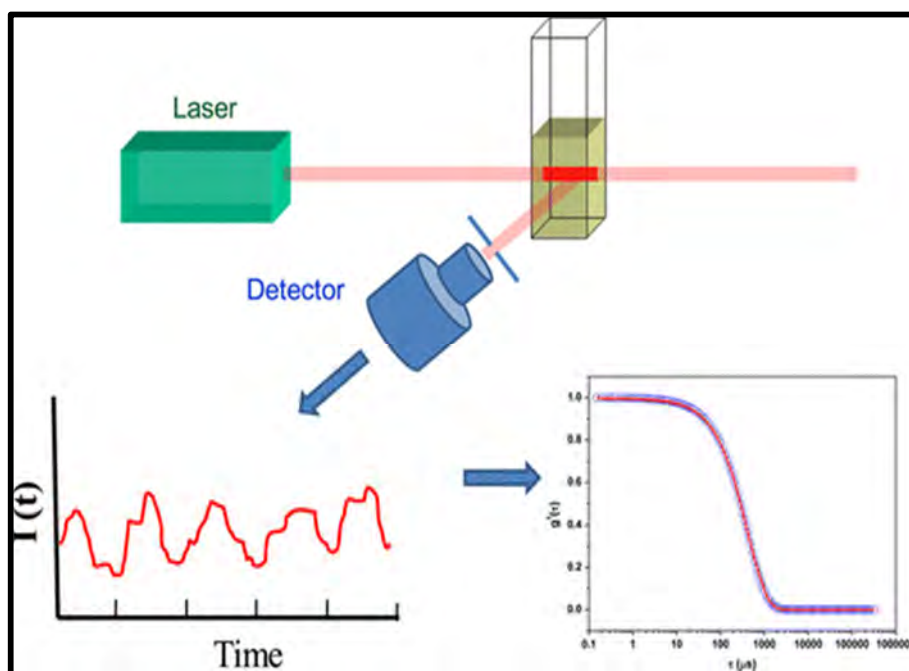
formulaciones farmacéuticas como la molienda húmeda del ibuprofeno (Liu y col., 2012), la disolución y la precipitación de fármaco (Kuentz, 2014).

Cuando el haz de luz láser incide en la superficie de cualquier partícula que pasa por un punto focal, es reflejada y el detector la registra en un pulso de luz de duración determinada (Figura 2.18). El producto entre velocidad lineal del punto focal y la duración del pulso de luz es la longitud de cuerda de la partícula detectada. Cada segundo, una gran cantidad de partículas atraviesan el punto focal en un momento determinado, por tanto, se obtiene una distribución de longitudes de cuerda de las partículas constituyendo la medida de la distribución del tamaño de gota de la muestra.

En la dispersión de luz dinámica (DLS) una fuente de luz láser incide sobre una solución muy diluida, las partículas suspendida en el disolvente presentan un movimiento browniano aleatorio (Figura 2.19). Un fotómetro posicionado a un ángulo dado de detección colecta la luz dispersada por las partículas y un correlador digital conectado a un software específico, permite obtener la función de autocorrelación de segundo orden de las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada a cada ángulo (Hoo y col., 2008) y, por ende, se obtiene la distribución de tamaños de gotas.



**Figura 2.18.** Medida por FBRM: a) Probeta de FBRM, b) Longitud de cuerda y c) Frecuencia de distribución de longitud de cuerda (Kumar y col., 2013)



**Figura 2.19.** Medida por DLS (Hassan y col., 2015)

#### 2.4.2.- Caracterización del soporte de la enzima inmovilizada

##### *Superficie específica*

El método Brunauer, Emmett y Teller (BET) se usa en la determinación de la superficie específica de sólidos porosos. El área BET se calcula partiendo de la adsorción de nitrógeno a baja presión y temperatura. El método BET considera que solo las fuerzas de atracción de van der Waals son las responsables del proceso de adsorción, y se basa en el supuesto de que una primera la capa de moléculas (interacción adsorbente-adsorbato) se adsorben sobre la superficie, mientras que en capas subsiguientes de moléculas adsorbidas sólo sufrirán condensación. La ecuación BET se presenta en la ecuación [2.9].

$$\frac{P_S}{V_A \cdot (P_0 - P_S)} = \frac{1}{V_m \cdot C_A} + \left( \frac{C_A - 1}{V_m \cdot C_A} \right) \cdot \frac{P_S}{P_0} \quad [2.9]$$

donde:  $P_S$  es la presión de la muestra (bar);  $P_0$  es la presión de saturación (bar);  $V_m$  es el volumen monocapa (mL);  $V_A$  es el volumen adsorbido (mL) y  $C_A$  es la constante relativa a la entalpía de adsorción (0,00156).

Para aplicar la función de BET se elige un intervalo de presiones relativas (generalmente 0,05 – 0,2 atm) a partir de los datos de la isoterma de adsorción que proporciona el equipo de medida volumen de gas adsorbido en función de las presiones relativas ( $V_A$  versus  $P_S$ ). Operando con los resultados del ajuste lineal de la ecuación

[2.6], se determina el volumen de la monocapa ( $V_m$ ), que permite el cálculo de la superficie específica BET, aplicando la expresión [2.10].

$$S_{BET} = \frac{V_m \cdot N_A \cdot A_M}{M_v} \quad [2.10]$$

donde:  $N_A$  es el número de Avogadro;  $A_M$  es la sección transversal ocupada por cada molécula de adsorbato (para  $N_2$  es  $0,162 \text{ nm}^2$ ) y  $M_v$  es el volumen molecular (para  $N_2$  es  $22414 \text{ mL}$ ).

### ***Distribución de tamaño de poro***

El método de Barret-Joyner-Halenda (BJH) emplea la ecuación de Kelvin [2.11] para determinar la distribución de tamaños de poro. Esta técnica permite calcular el radio de la molécula líquida en el capilar, haciendo uso de la corrección por área de las paredes del poro, para correlacionar la presión relativa de nitrógeno en equilibrio con el sólido poroso con el tamaño de poros, suponiendo estos cilíndricos. Los mesoporos se van llenando progresivamente con adsorbato por un proceso de condensación capilar. Sucesivas capas de moléculas van condensando a medida que aumenta el tamaño del poro, hasta que todos los mesoporos y macroporos estén llenos de adsorbato líquido, momento en el que  $P_s/P_0$  alcanza la unidad. A lo largo de la isoterma de desorción, el volumen desorbido de la muestra a diferentes valores decrecientes de presiones relativas se transforma en volúmenes equivalentes de líquido.

$$R \cdot T_{N_2} \cdot \ln \frac{P_s}{P_0} = 2 \cdot \gamma \cdot \frac{V_m}{R_K} \quad [2.11]$$

donde:  $R$  es la constante de los gases ( $\text{erg mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ );  $T_{N_2}$  es la temperatura de ebullición de nitrógeno (K);  $\gamma$  es la tensión superficial del adsorbato y  $R_K$  es el radio de Kelvin (cm).

Sustituyendo los valores de las diferentes constantes y resolviendo la ecuación [2.11] para  $R_K$ , se obtiene la ecuación [2.12]. El espesor de la película de nitrógeno adsorbido en las paredes del poro a una presión relativa dada, se calcula con la ecuación modificada de Halsey [2.13]. El valor final de radio de poro,  $R_P$ , se determina por adición del espesor de capa,  $t$ , al valor de radio Kelvin,  $R_K$ .

$$R_K(\text{\AA}) = 4,14 \cdot \log \frac{P_s}{P_0} \quad [2.12]$$

$$\delta_c = 3,54 \cdot \left[ \frac{5}{2,30 \cdot \log \frac{P_0}{P_s}} \right]^{1/3} \quad [2.13]$$

donde:  $P_s$  es la presión de la muestra (bar);  $P_0$  es la presión de saturación (bar);  $R_K$  radio kelvin (cm);  $t$  espesor de la capa (Å).

## 2.5.- MÉTODOS MATEMÁTICOS

En la determinación de los parámetros cinéticos de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno; el ajuste de los modelos a los datos experimentales obtenidos se lleva a cabo por regresión no lineal, empleando el algoritmo de Marquardt-Levenberg y la integración numérica por el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden, ya que se manejan datos integrales, cambio de concentración con el tiempo (García-Ochoa y col., 1992). Así, se hace uso del programa *Aspen Custom Modeler* que incluye subrutinas para cada algoritmo. El proceso de discriminación entre modelos cinéticos para seleccionar el modelo que mejor se ajusta a los resultados experimentales se ha efectuado a través de varias etapas. En primer lugar, en el ajuste de los modelos cinéticos se considera la evaluación de individual de cada experimento, donde la temperatura se mantiene constante. Posteriormente, los parámetros obtenidos para cada temperatura se han utilizado para obtener valores iniciales de los logaritmos neperianos de los factores preexponenciales y de las energías de activación utilizando la forma linealizada de la ecuación de Arrhenius (ecuación [2.14]). El último paso ha consistido en el ajuste multivariable de los modelos cinéticos incluyendo todos los datos experimentales a la vez, con la temperatura como variable independiente incluida en las ecuaciones diferenciales a través de ecuaciones tipo Arrhenius para cada constante cinética. En cada etapa de discriminación se han considerado varios criterios físicos y estadísticos para seleccionar el modelo que se ajuste mejor a los datos experimentales. El procedimiento de ajuste a los datos experimentales se explica en el diagrama de flujo de la Figura 2.20.

$$\ln k_i = \ln k_{i,0} - \frac{E_{a,k}}{R \cdot T} \quad [2.14]$$

Para la discriminación de los modelos cinéticos se han considerado criterios físicos y estadísticos para seleccionar el modelo más representativo. El principal criterio físico fue obtener un valor adecuado en la energía de activación, ha de ser siempre positivas y ser mayor a 20 KJ/mol y no superior a 300 KJ/mol. En cuanto, a los criterios estadísticos se consideró el error residual medio al cuadrado (RMSE), el valor de la F de Fisher (F), el criterio de información de Akaike corregido (AICc) y el criterio de

información bayesiano (BIC). Para comprobar la bondad del ajuste de los modelos la F debe alta, mientras que RMSE, AICc y BIC tienen que ser valores muy bajos. Estos parámetros se definen en las siguientes ecuaciones.

El error residual medio al cuadro (RMSE), es una medida de la diferencia entre los valores predichos de la variable y los observados. Tiene en cuenta la cantidad de datos y el número de parámetros del modelo, se calcula de acuerdo a la ecuación [2.15]:

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^{N_t} \frac{(y_e - y_c)_i^2}{N_{dexp}}} \quad [2.15]$$

El valor de la F de Fisher definido en la ecuación [2.13], se basa en una hipótesis que dice que el modelo es adecuado a los valores observados de la variable medida.

$$F - \text{Fisher} = \frac{\sum_{n=1}^{N_t} \frac{(y_c)^2}{K}}{\sum_{n=1}^{N_t} \frac{(y_e - y_c)^2}{N_{dexp} - K}} \quad [2.16]$$

Los criterios de información AICc y BIC son estadísticos que resuelven el problema de la sobreparametrización, mediante la introducción de un término de penalización en el número de parámetro en el modelo. La corrección (AICc), ecuación [2.17], es adecuada para una relación de número de datos ( $N_{dexp}$ ) a número de parámetros del modelo ( $K$ ) inferior a 40 (Ladero y col., 2012). El BIC se define en la ecuación [2.18].

$$AICc = N_t \cdot \ln\left(\frac{SQR}{N_{dexp}}\right) + 2 \cdot K + \frac{2 \cdot K \cdot (K + 1)}{N_{dexp} - K - 1} \quad [2.17]$$

$$BIC = \ln\left(\frac{SQR}{N_{dexp}}\right) + \frac{K}{N_{dexp}} \ln(N_{dexp}) \quad [2.18]$$

El porcentaje de variación explicada, %VE, viene dado por las ecuaciones [2.19], [2.20], [2.21] y [2.22]. El programa Aspen Custom Modeler, por defecto considera al parámetro de heteroscedasticidad ( $\gamma_i$ ) igual a la unidad (Esteban y col., 2014).

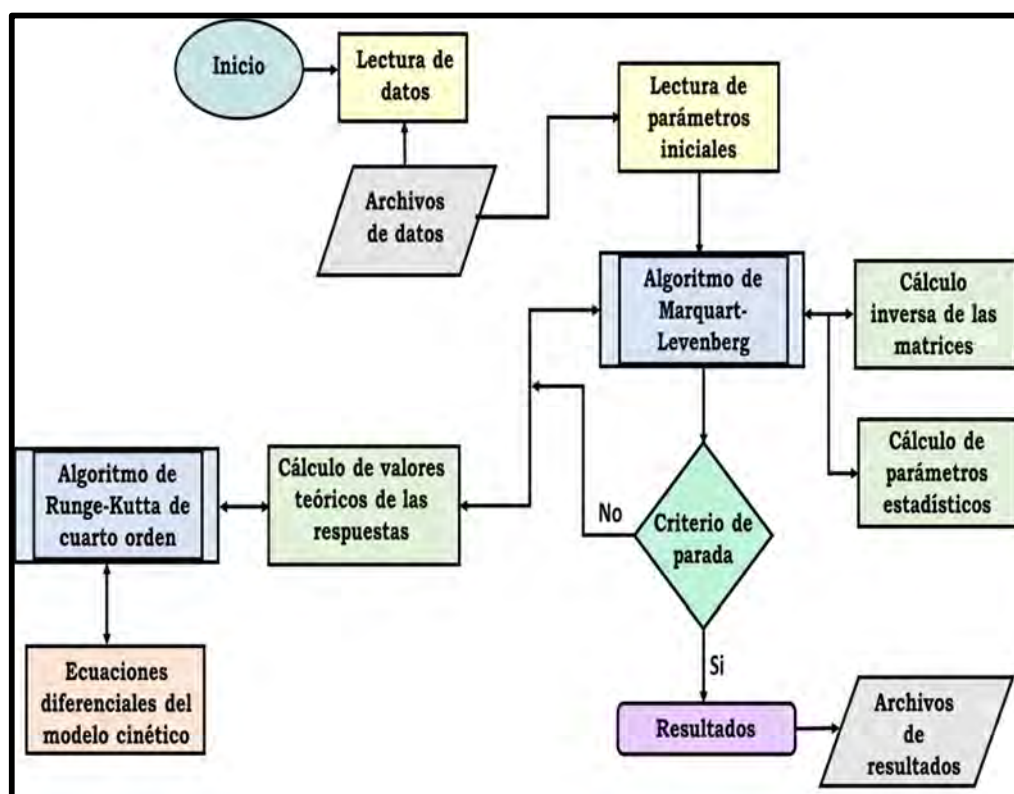
$$\%VE = 100 \cdot \left(1 + \frac{\sum_{l=1}^L SSQ_l}{\sum_{l=1}^L SSQ_{promedio_l}}\right) \quad [2.19]$$

$$SSQ_l = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,e} - y_{i,c})^2}{y_{i,c}^{\gamma_l}} \quad [2.20]$$



$$SSQ_{promedio_1} = \sum_{i=1}^N \frac{(y_{i,e} - \bar{y}_{i,c})^2}{y_{i,c}^{y_1}} \quad [2.21]$$

$$\bar{y}_{i,e} = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{y_{i,e}}{y_{i,c}^{y_1/2}}}{\sum_{i=1}^N \frac{1}{y_{i,c}^{y_1/2}}} \quad [2.22]$$



**Figura 2.20.** Diagrama de flujo del método de ajuste, por regresión no lineal en múltiple respuesta, de los modelos cinéticos propuestos a los datos experimentales

## 2.6.- REFERENCIAS CITADAS

- Blanco, A., E. Fuente, C. Negro y J. Tijero (2002). Flocculation Monitoring: Focused Beam Reflectance Measurement as a Measurement Tool. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **80** (4): 1-7.
- Chen, B., J. Hu, E. M. Miller, W. Xie, M. Cai y R. A. Gross (2008). Candida antarctica lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro-and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* **9** (2): 463-471.
- Esteban, J., E. Fuente, M. Gonzalez-Miquel, A. Blanco, M. Ladero y F. Garcia-Ochoa (2014). Sustainable joint solventless coproduction of glycerol carbonate and ethylene glycol via thermal transesterification of glycerol. *RSC Advances* **4** (95): 53206-53215.
- García-Ochoa, F., A. Romero y V. E. Santos (1992). Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *Int. Chem. Eng.* **32** (2): 538-551.
- Hassan, P. A., S. Rana y G. Verma (2015). Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* **31** (1): 3-12.
- Hoo, C. M., N. Starostin, P. West y M. L. Mecartney (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research* **10** (1): 89-96.
- Hoyt, L. F. (1934). New Table of the Refractive Index of Pure Glycerol at 20°C. *Industrial & Engineering Chemistry* **26** (3): 329-332.
- Kuentz, M. (2014). Analytical technologies for real-time drug dissolution and precipitation testing on a small scale. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.
- Kumar, V., M. Taylor, A. Mehrotra y W. Stagner (2013). Real-Time Particle Size Analysis Using Focused Beam Reflectance Measurement as a Process Analytical Technology Tool for a Continuous Granulation–Drying–Milling Process. *AAPS PharmSciTech* **14** (2): 523-530.
- Ladero, M., M. de Gracia, F. Trujillo y F. Garcia-Ochoa (2012). Phenomenological kinetic modelling of the esterification of rosin and polyols. *Chemical Engineering Journal* **197**: 387-397.
- Liu, L. X., A. Rashid, I. Marziano, E. T. White, T. Howes y J. D. Litster (2012). Flowability of binary mixtures of commercial and reprocessed ibuprofen through high shear wet milling (HSWM) with lactose. *Advanced Powder Technology* **23** (4): 454-458.
- Mei, Y., L. Miller, W. Gao y R. A. Gross (2003). Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy. *Biomacromolecules* **4** (1): 70-74.

---

*Capítulo 3*  
**ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA  
CALB-L sin COSOLVENTE**

---



### 3.- ESTERIFICACIÓN DE GLICERINA CON IBUPROFENO CATALIZADA POR LA ENZIMA CALB-L: PROCESO SIN COSOLVENTE

La esterificación de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) perteneciente al grupo de los profenos (ácidos 2-aril propiónicos) se puede llevar a cabo por dos vías:

- a) Esterificación en presencia de catalizadores ácidos (generalmente ácido sulfúrico,  $H_2SO_4$ , de la que se puede encontrar antecedentes en la literatura, por ejemplo, en la esterificación del ibuprofeno (Chavez-Flores y col., 2012), flurbiprofeno (Mohan, 2007), y ketoprofeno (Hartwig y col., 2009).
- b) Esterificación catalizadas por enzimas; lipasas de varios orígenes han sido usadas en la esterificación de profenos, siendo la lipasa B de *Candida antarctica* en su forma libre e inmovilizada, la más usada en esta síntesis; por ejemplo, en los siguientes trabajos sobre esterificación de ibuprofeno (Foresti y col., 2009), naproxeno ((Morrone y col., 2010) y ketoprofeno (Ong y col., 2006).

La esterificación enzimática en disolventes orgánicos ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, los disolventes pueden ser volátiles y tóxicos para el medioambiente; además, su empleo puede presentar inconvenientes en el cambio de escala en la producción del éster, debido a las grandes cantidades de disolvente que es necesario utilizar y elevado gasto energético en las etapas de recuperación de disolvente; como alternativa, se han utilizado líquidos iónicos o fluidos supercríticos. En la literatura, se puede encontrar el estudio de la esterificación del ibuprofeno usando diversas lipasas en un sistema que contiene líquidos iónicos [BMIM][PF<sub>6</sub>] y [BMIM][PF<sub>4</sub>] (Contesini y col., 2006); por otro lado, se ha experimentado con la esterificación del ibuprofeno racémico usando la enzima inmovilizada CALB (Novozym 435) en presencia de CO<sub>2</sub> supercrítico (Overmeyer y col., 1999).

En este contexto, surgen como una opción interesante desde el punto de vista medioambiental y económico los sistemas libres de disolventes (solvent-free medium). Estos sistemas se caracterizan por presentar varias fases (multifásicos), ya sea por la presencia de un catalizador sólido o por la escasa miscibilidad de los componentes de la mezcla. La presencia de un sistema multifásico puede suponer la existencia de limitaciones a la transferencia de materia, siendo una desventaja desde el punto de vista cinético (Kim y col., 1991; Selmi y col., 1997). Se han publicado varios trabajos que estudian la esterificación en un medio libre de disolvente; por ejemplo, la obtención de

monoglicéridos y diglicéridos a partir de la glicerólisis del aceite de soja con la CALB en un medio libre de solvente (Fregolente y col., 2008); también se ha experimentado en un sistema sin disolvente para la producción de  $\alpha$ -monobenzoato del glicerol por esterificación enzimática con CALB (Tamayo y col., 2012)

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizado por la preparación enzimática Lipozyme CALB-L en un medio sin cosolvente, planteándose los siguientes objetivos:

1. Determinar las condiciones de operación adecuadas para llevar a cabo la reacción de esterificación de glicerina e ibuprofeno en presencia de la CALB en su forma libre.
2. Proponer un modelo cinético que permita describir los resultados experimentales obtenidos. Para ello, después de formular diversos modelos, se procederá a seleccionar el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales, utilizando criterios físicos y estadísticos (Esteban y col., 2014; Garcia-Ochoa y col., 1992; Ladero y col., 2012)

### **3.1.- EXPERIMENTOS PREVIOS**

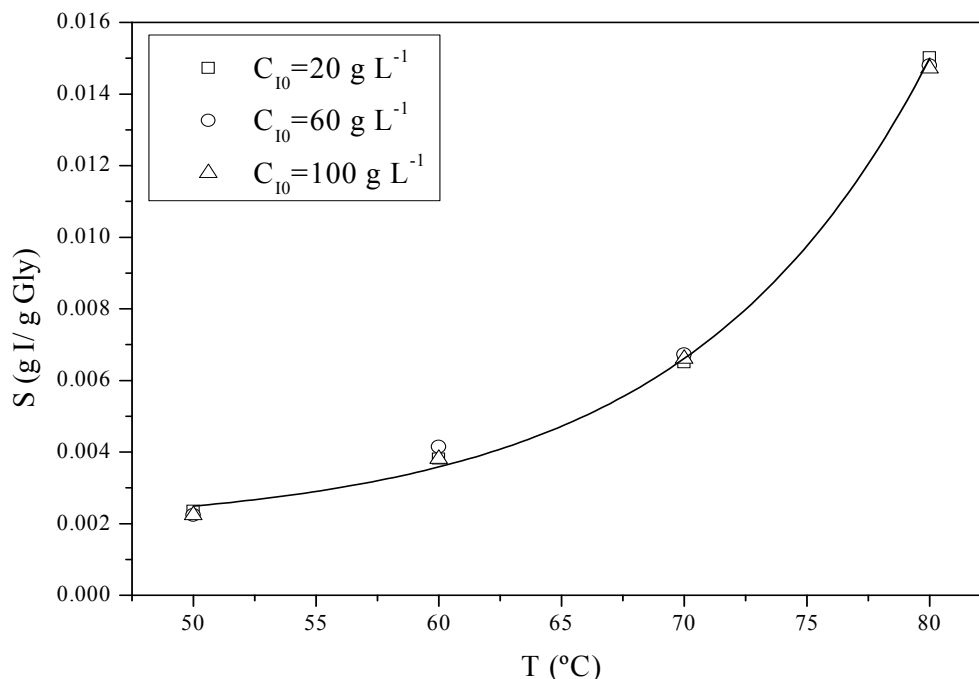
Este sistema se caracteriza por tener la enzima en disolución, se considera un sistema bifásico L-S, donde la fase líquida L está formada por la glicerina y la enzima libre CALB-L, mientras que la fase sólida S es ibuprofeno. Para dar cumplimiento al primer objetivo planteado, se realizaron una serie de experimentos previos, analizando el efecto de las siguientes variables sobre la reacción de esterificación:

- Solubilidad de ibuprofeno en glicerina
- Efecto de la cantidad de enzima
- Efecto de la velocidad de agitación
- Efecto de la temperatura y concentración inicial de ibuprofeno
- Efecto de la concentración de agua.

#### **3.1.1.- Solubilidad del ibuprofeno en glicerina**

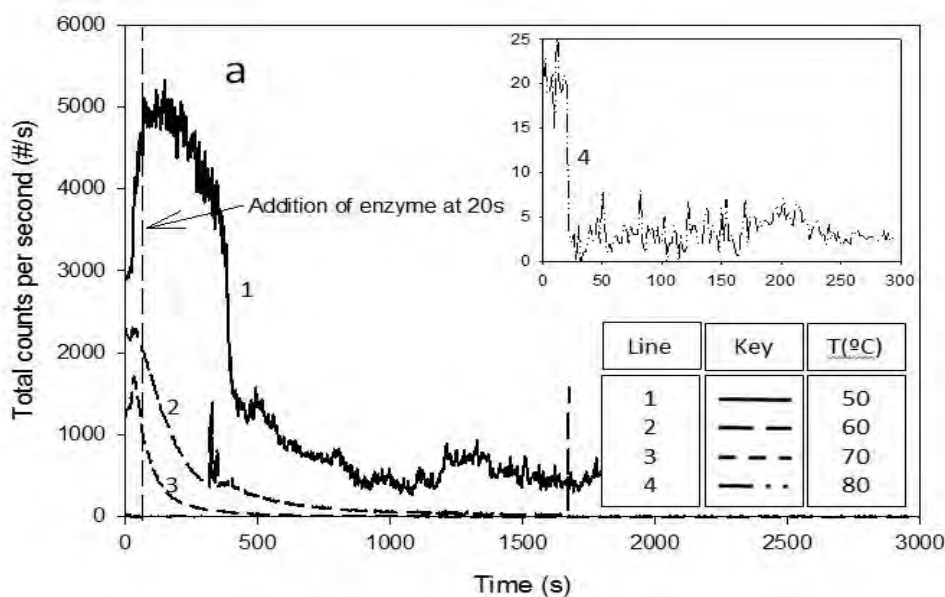
La Figura 3.1 presenta los resultados obtenidos en la medida de la solubilidad del ibuprofeno en glicerina. Esta fue determinada a diferentes temperaturas 50, 60, 70 y 80 °C y concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1. Como se puede observar, a baja temperatura la solubilidad

del ibuprofeno es baja ( $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pero se incrementa exponencialmente con la temperatura, alcanzando  $19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $80^\circ\text{C}$ . Esta variable favorece la disolución del ibuprofeno en la glicerina; además, el ibuprofeno tiene una temperatura de fusión de  $75^\circ\text{C}$  (Maxwell y col., 2012), por lo que podría entenderse su mejor disolución en la glicerina a temperatura por encima de este valor.



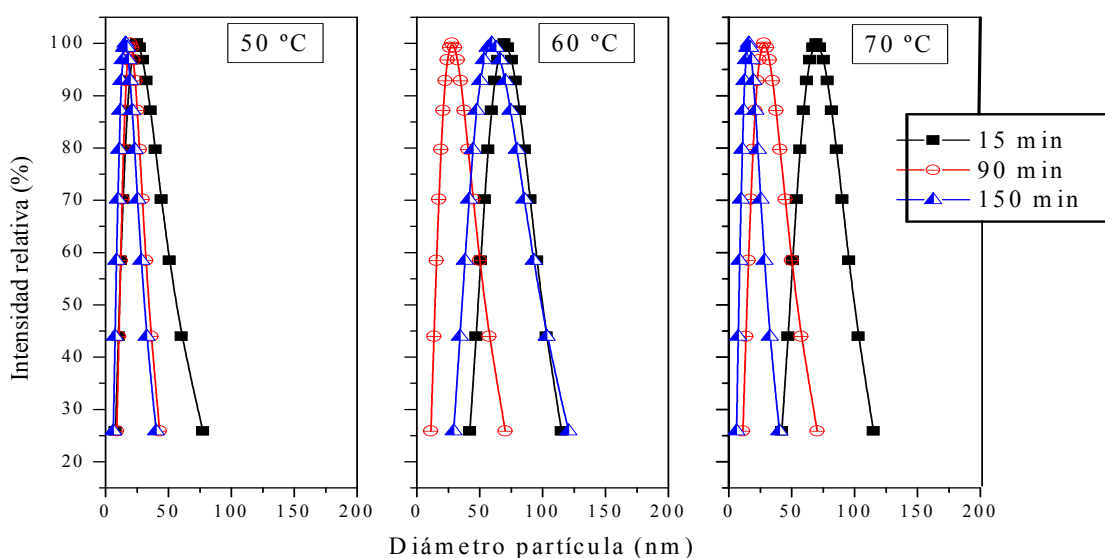
**Figura 3.1.** Curva de solubilidad del ibuprofeno en glicerina

La caracterización de la suspensión-emulsión, formada cuando se mezcla el ibuprofeno con glicerina y luego se añade el preparado enzimático de CALB-L, fue realizada usando la técnica de FBRM para caracterizar gotas de gran tamaño ( $1\text{-}1000\mu\text{m}$ ) y también la espectrofotometría de luz ultravioleta-visible a  $600 \text{ nm}$  de longitud de onda. Las partículas de gotas más pequeñas fueron analizadas por la técnica láser de luz dinámica dispersa (DLS). En la Figura 3.2, se muestran los datos obtenidos por FBRM para las condiciones de reacción de  $C_{10}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y un intervalo de temperatura entre  $50$  y  $80^\circ\text{C}$ . Como se puede apreciar, el número de las gotas y el promedio de longitud de cuerda disminuye con el tiempo de reacción; esto es más evidente a altas temperaturas y altas conversiones. A una temperatura de  $80^\circ\text{C}$  es casi imposible detectarlas, ya que el ibuprofeno está prácticamente disuelto en la glicerina.



**Figura 3.2.** Caracterización de la emulsión glicerina-ibuprofeno-enzima CALB-L a diferentes temperaturas por FBRM mostrando el total de cuentas por segundo

En la Figura 3.3, se dan los datos de las medidas de DLS; se puede apreciar la presencia de un tamaño de gota en el rango nanométrico y la evolución de su tamaño con el progreso de la reacción de esterificación a varias temperaturas entre 50 y 70 °C. Curiosamente, a 50 °C las nanogotas formadas tiene un diámetro promedio de 50  $\mu\text{m}$ , mientras que, a mayor temperatura, el tamaño promedio de las nanogotas parece tener valores superiores, en el intervalo de 150-200 nm.

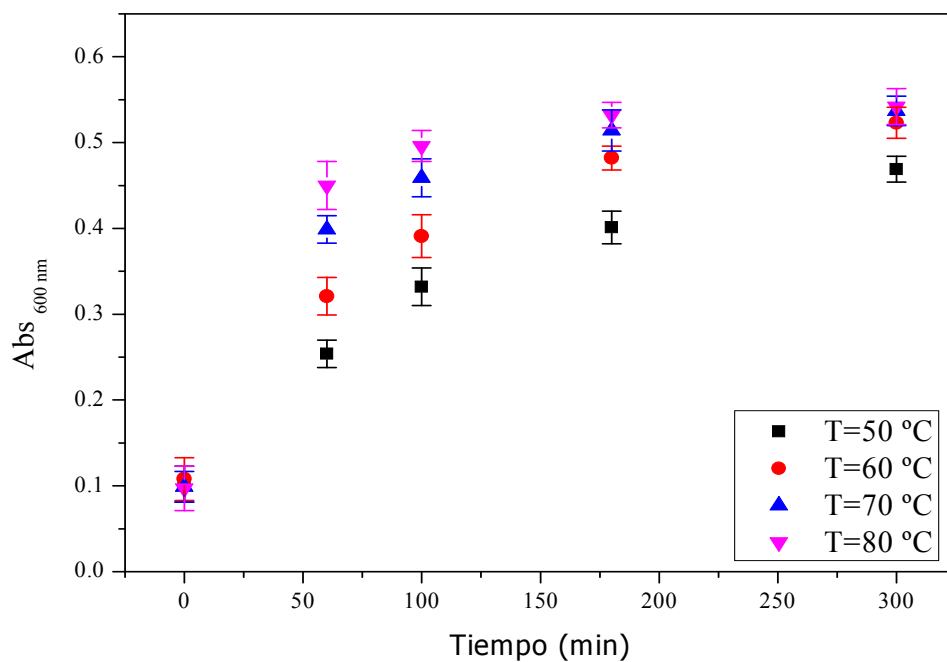


**Figura 3.3.** Caracterización de la emulsión glicerina-ibuprofeno-enzima CALB-L a diferentes temperaturas por DLS

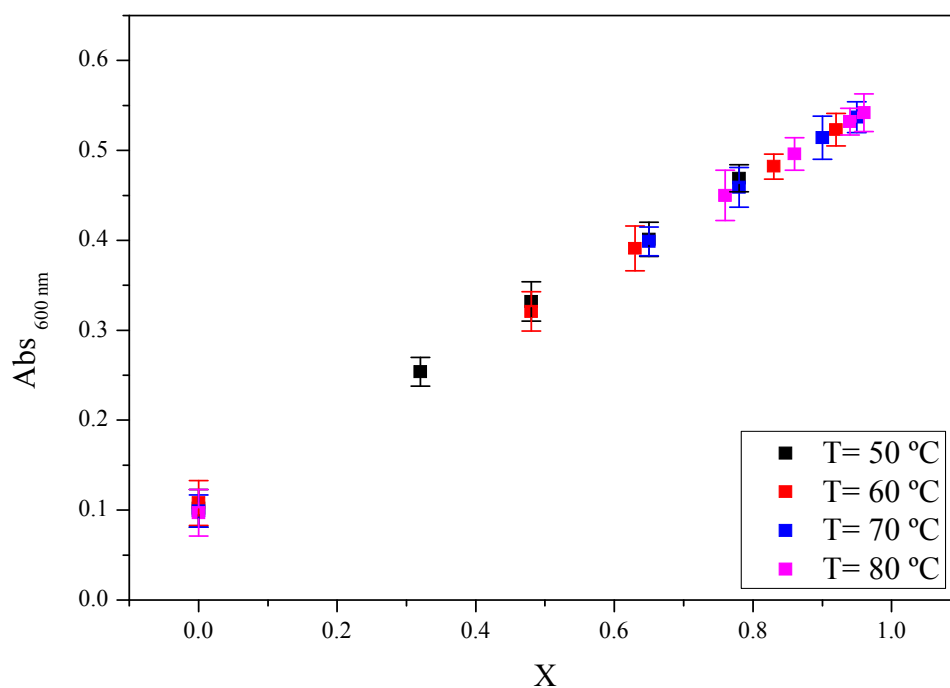


La Figura 3.4 muestra los resultados de la espectrofotometría de UV-vis; hay un incremento en la absorbancia con el tiempo dentro del intervalo de temperatura entre 50 y 80 °C. En la Figura 3.5, se observa que la absorbancia es proporcional a la conversión de ibuprofeno para cada una de las temperaturas estudiadas.

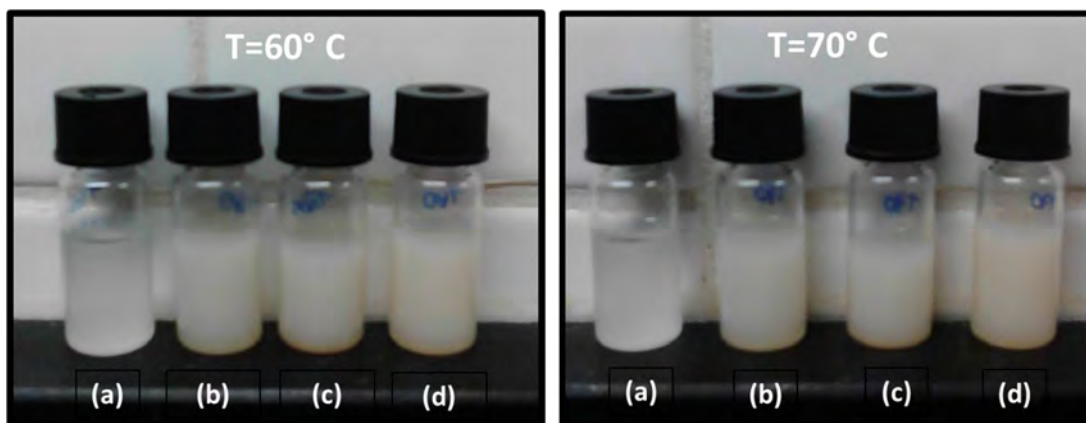
Considerando la capacidad emulsificante del monoéster de ibuprofeno (monoglicérido), cerca o sobre el punto de fusión del ibuprofeno, parece que un proceso de emulsificación tiene lugar a todas las temperaturas, siendo más acusado a alta temperatura. Esta variable tiene un papel importante en la suspensión-emulsión. Cuando su valor es bajo, el medio bifásico es una emulsión con diámetro medio de gotas entre 40 y 50  $\mu\text{m}$ . Con un incremento en la temperatura, se reduce el número de gotas grandes, de diámetro mayor de 1  $\mu\text{m}$ , pero curiosamente el tamaño promedio de partículas grandes no varía. Por tanto, se observa una distribución bimodal de gotas y la cantidad dispersa de ibuprofeno en nanogotas y gotas grandes depende de la temperatura y del tiempo de reacción. La producción de monoglicéridos de ácidos fenólicos resulta ser importante en la evolución temporal de la dispersión, como se mostró con todas las técnicas usadas en estas medidas. El tamaño de gota no parece cambiar demasiado, principalmente en la región de diámetros más grandes, pero un incremento en la turbidez sugiere que el ibuprofeno y, probablemente, componentes añadidos en la Lipozyme CALB-L, vuelven más y más dispersa la dispersión sólido-líquido, que se convierte en una emulsión de aspecto blanco lechoso a bajas temperaturas, o una microemulsión más clara de aspecto traslucido a 70 y 80 °C o, por lo menos, a altos valores de conversión (altas concentraciones de monoglicéridos), como puede verse en la Figura 3.6. Estas microemulsiones no muestran un incremento en el tamaño de partículas o separación durante meses, como se espera de las dispersiones estables termodinámicamente (Prajapati y col., 2012).



**Figura 3.4.** Emulsión a diferentes temperaturas medidas por turbidimetría, mostrando absorbancia a 600 nm *versus* tiempo de reacción



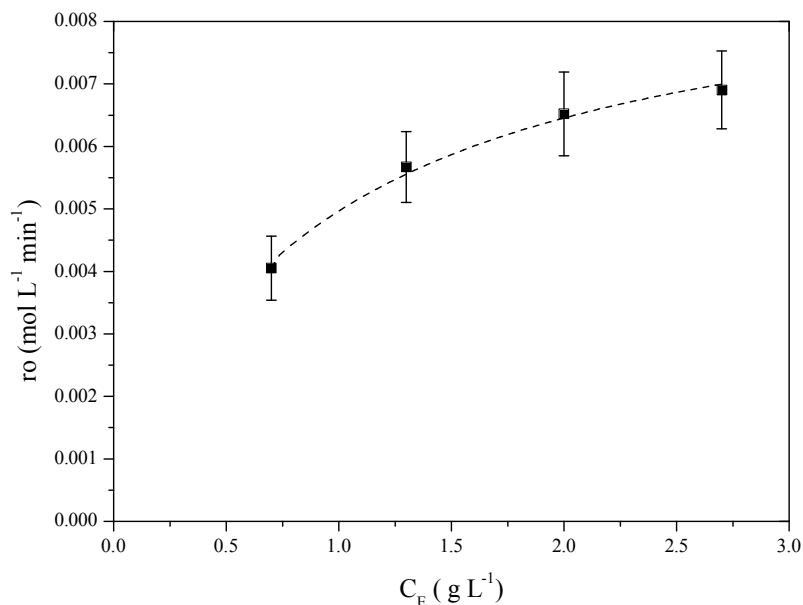
**Figura 3.5.** Emulsión a diferentes temperaturas medidas por turbidimetría, mostrando absorbancia a 600 nm *versus* conversión



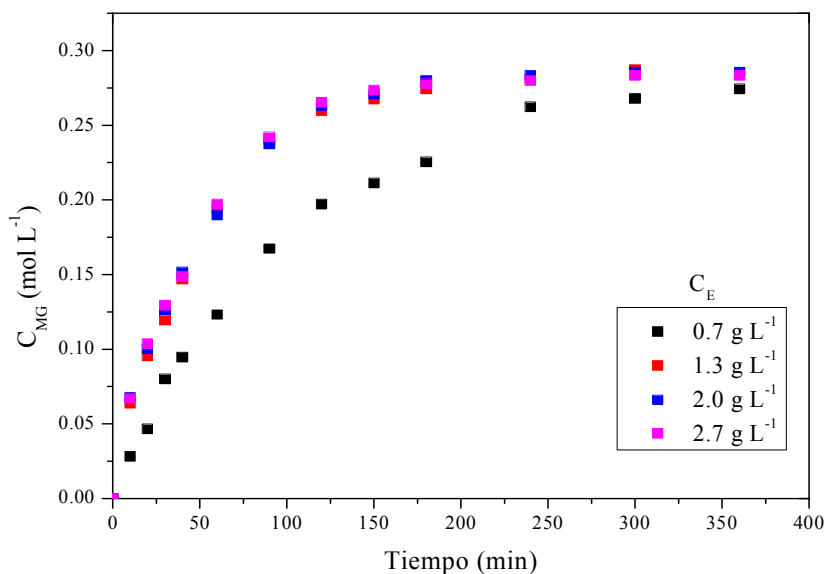
**Figura 3.6.** Emulsión de esterificación glicerina con ibuprofeno catalizada por CALB-L a diferentes tiempos de reacción (a)  $t=0$ , (b)  $t=30\text{min}$ , (c)  $150\text{ min}$  y (d)  $20\text{ h}$

### **3.1.2.- Efecto de la concentración de enzima**

La influencia de la concentración de enzima en la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno fue evaluada entre  $0,7$  y  $2,7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de concentración de enzima. En la Figura 3.7 se muestra la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima ( $C_E$ ); como se puede observar, la velocidad inicial aumenta con la cantidad de enzima siguiendo una tendencia saturante, debido a la dispersión de la lipasa en la superficie de las gotas formadas por el ibuprofeno y sustancias contenidas en el preparado de la enzima, lo que lleva a un efecto de "overcrowding" típico de las enzimas que actúan desde o en las interfases, como es el caso de las lipasas y celulasas. Con una alta concentración de enzima hay más sitios activos disponibles para el anclaje del sustrato en la enzima y, por ende, la velocidad de reacción aumenta. Sin embargo, como se presenta en Figura 3.8, la concentración del monoéster de ibuprofeno (MG) no alcanza cambios significativos por encima de  $1,3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de concentración de enzima.



**Figura 3.7.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima CALB-L.  
Condiciones:  $C_{I0}=60$  g·L<sup>-1</sup>;  $T=70$  °C;  $N=720$  rpm

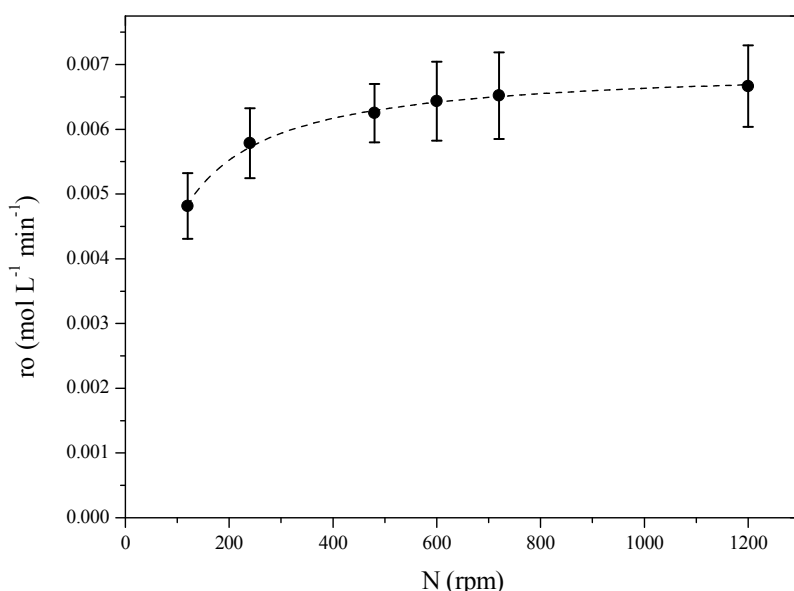


**Figura 3.8.** Concentración de MG en función del tiempo de reacción a distintas concentraciones de enzima CALB-L.  
Condiciones:  $C_{I0}=60$  g·L<sup>-1</sup>;  $T=70$  °C;  $N=720$  rpm

### 3.1.3.- Efecto de la velocidad de agitación

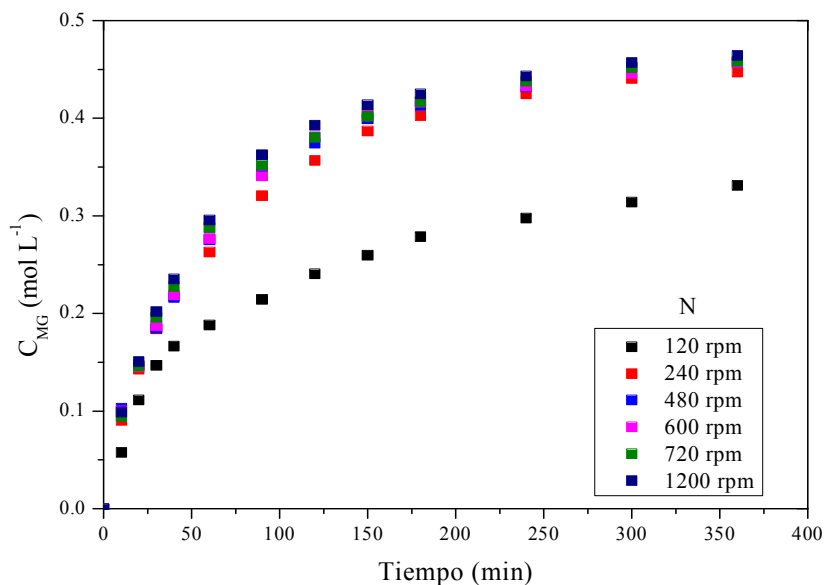
Por ser un sistema bifásico, la influencia de la velocidad de agitación fue estudiada entre 120 y 1200 rpm, para de esta manera, comprobar la posible existencia de

limitaciones al transporte de materia. Como puede observarse en la Figura 3.9, a baja velocidad de agitación el contacto entre las fases es escaso, pero se incrementa hasta un punto donde apenas hay cambios significativos en la velocidad inicial de esterificación de ibuprofeno con glicerina. Así, las posibles limitaciones del transporte de materia no son significativas a partir de 600 rpm. De igual forma, la concentración del monoéster de ibuprofeno (MG) formado es independiente de la velocidad de agitación a partir de 240 rpm, y sin duda a partir de 480 rpm (Figura 3.10). Yadav y col. (2010) han obtenido resultados parecidos en la hidracinólisis enzimática de hidracina con benzoato de fénilo, afirmando que no hay limitaciones en la transferencia materia sobre 600 rpm usando la enzima CALB. Por tanto, y con un margen de seguridad, para establecer un buen contacto entre las fases presentes se elige una agitación de 720 rpm para la realización de la posterior experimentación.



**Figura 3.9.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la velocidad de agitación.

Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$



**Figura 3.10.** Concentración de MG en función del tiempo de reacción a distintas velocidades de agitación.

Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

### 3.1.4.- Estudio de efectos de inhibición y de desactivación

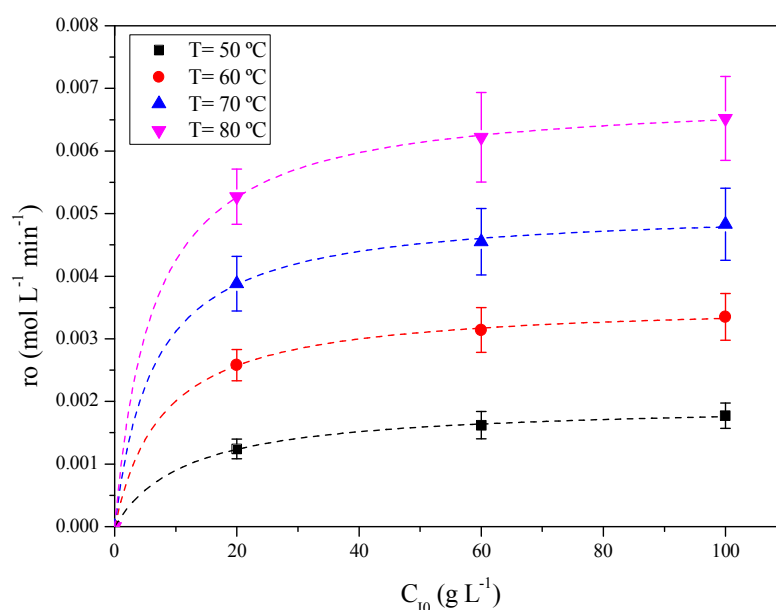
Las enzimas tienen un complejo mecanismo catalítico y su actividad está afectada por la temperatura y por la presencia de reactivos y productos en el medio de reacción. Por esta razón, se han realizado una serie de experimentos que estudian el efecto que tiene la concentración del ibuprofeno (reactivo), la cantidad de agua (producto) y la temperatura, en la velocidad de la reacción enzimática. No se estudia el efecto de la glicerina porque, en toda la experimentación, se encuentra en un gran exceso con respecto a las concentraciones de ibuprofeno y de los productos de la reacción.

#### *Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno*

Para comprobar el posible efecto inhibidor de los reactivos, se han realizado diferentes experimentos variando la cantidad inicial de ibuprofeno entre  $20$  a  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que para estudiar la posible desactivación por temperatura se ha estudiado esta variable entre  $50$  y  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , manteniendo constante la concentración de enzima CALB-L ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el volumen de glicerina ( $20 \text{ mL}$ ). En la Figura 3.11, se puede apreciar que, a cualquier temperatura considerada, la velocidad inicial de esterificación se incrementa con la concentración inicial de ibuprofeno, de forma saturante, hasta un punto donde los cambios son casi inapreciables. Este comportamiento saturante es típico de la cinética de

Michaelis-Menten sin inhibición por sustrato. El comportamiento es hiperbólico, saturante, no sigmoidal, por lo que parece no existir una concentración crítica de sustrato a la cual la enzima es activada por la presencia de sustrato lipofílicos insolubles (hiperactivación interfacial); comportamiento típico de lipasas estrictas, que necesitan abrir su centro activo por interacción con la interfase. La lipasa CALB se comporta como una esterasa, pues su centro activo es accesible siempre (Paiva y col., 2000).

Además, ningún efecto de desactivación fue observado en los casos de estudio, incluso a altas temperatura y a altas concentraciones del ácido (ibuprofeno). Un comportamiento distinto ha sido observado en trabajos anteriores (Tamayo, 2014), usando ácido benzoico como sustrato en idénticas o similares condiciones de concentración, temperatura y velocidad de agitación. Por tanto, parece que el ibuprofeno es un agente de desactivación más suave que el ácido benzoico, a pesar del hecho de que su valor de pH en el medio de reacción es más bajo cuando el sustrato es ibuprofeno (1,8) que cuando lo es el ácido benzoico (3,2). En cuanto a la temperatura, Réjasse y col. (2006) y Tamayo (2014); para el citado sistema de esterificación con ácido benzoico, han demostrado que la enzima CALB en su forma libre presenta una temperatura óptima donde la actividad enzimática es máxima, un valor de  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; por encima de esta temperatura la actividad de la enzima comienza a disminuir; por tanto, hay una fuerte desactivación por efecto de la temperatura; esto no se observa con el ibuprofeno y la enzima libre.



**Figura 3.11.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina e ibuprofeno frente a la concentración inicial de ibuprofeno.

### ***Efecto de la concentración de agua***

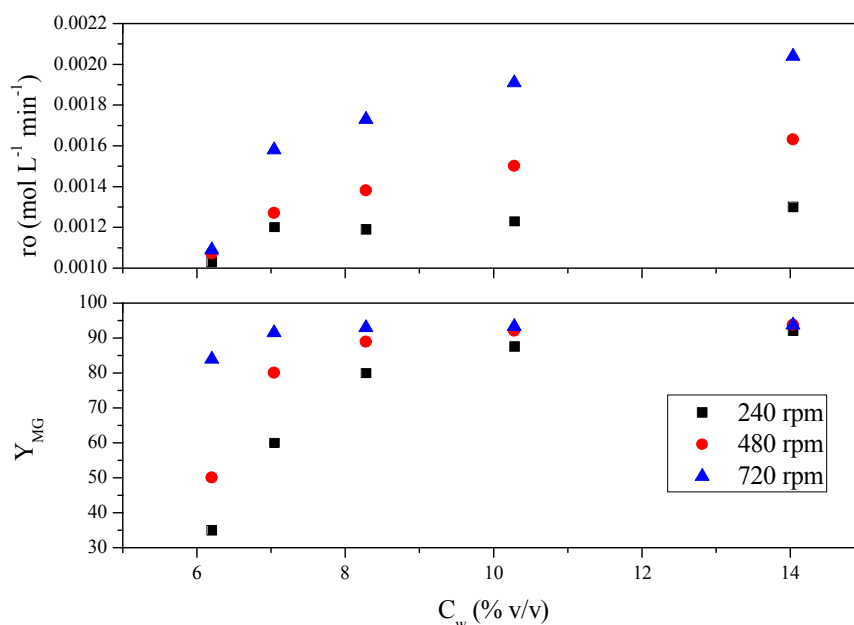
La inhibición por agua, un producto de la esterificación de glicerina e ibuprofeno, se ha estudiado añadiendo agua a la mezcla inicial de reacción, en el intervalo de 6 a 15 %v/v, a distintas velocidades de agitación (240, 480 y 720 rpm), una temperatura fija de 80 °C, una concentración inicial de ibuprofeno de 100 g·L<sup>-1</sup>, y con una concentración de enzima de 2 g·L<sup>-1</sup>. Todas las muestras de los experimentos siempre tienen una cierta cantidad de agua debido a que el preparado enzimático está formado por glicerina, sorbitol y agua, como se ha mostrado en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos; lo que se estudia es la importancia del volumen añadido de agua en cada experimento.

Como se puede observar en la Figura 3.12a, adicionando pequeñas concentraciones de agua, se produce un incremento en la velocidad inicial de esterificación, lo que puede ser debido al cambio de viscosidad del medio líquido; es bien conocido que la viscosidad de la glicerina disminuye exponencialmente con la adición de agua y el aumento de la temperatura. Por tanto, el aumento de la velocidad resulta ser una estrategia importante en la mejora del contacto líquido-líquido donde la transferencia de materia entre las fases podría limitar la transferencia global del sustrato (reactivo). Por otra parte, el agua podría aumentar la flexibilidad del biocatalizador y, consecuentemente, la actividad enzimática, como han sugerido otros autores (Foresti y col., 2007; Klivanov, 2001). Adicionalmente, en la Figura 3.12b, se muestra el efecto del agua en el rendimiento final del producto a distintas velocidades de agitación. El agua es capaz de mejorar el rendimiento final del éster para concentraciones mayores de 10 %v/v. Sin embargo, gran cantidad de agua podría facilitar la hidrólisis del éster, siendo la esterificación una reacción reversible; en este caso, la glicerina, por estar en mucha concentración, impide la reacción inversa (hidrólisis), incluso si el agua es el segundo compuesto más abundante del medio de reacción.

El efecto de las limitaciones en la transferencia de materia a diversas concentraciones iniciales de agua es evidente en el sistema de reacción, ya que con el incremento en la velocidad de agitación de 240 a 720 rpm, hay un incremento en la velocidad inicial de esterificación y del rendimiento final del monoéster (MG). Además, con un incremento de la velocidad de agitación, se alcanzan valores altos para ambos parámetros (velocidad inicial y rendimiento). En consecuencia, se ha seleccionado una agitación de 720 rpm para el resto de la experimentación y al mismo tiempo, la adición de



agua dio lugar a la disminución de la resistencia a la transferencia de materia, como ya se ha mencionado. Por tanto, hay dos posibilidades de estudio: el uso de sistemas que reaccionan donde el único añadido de agua es el que se incluye en la preparación de la enzima comercial (6 %v/v de agua), y de sistemas con agua añadida en concentraciones de 10 al 15 %v/v, donde la hidrólisis parece estar ausente, pero se reducen las limitaciones de transferencia de materia.



**Figura 3.12.** Concentración de agua y velocidad de agitación en a) rendimiento final de monoéster de ibuprofeno (MG) y b) velocidad inicial de esterificación.  
Condiciones:  $C_{i0} = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T = 80 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $C_E = 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

### 3.2.- DETERMINACIÓN DEL MODELO CINÉTICO

En este apartado, se muestran los resultados obtenidos a varias concentraciones de ibuprofeno y temperaturas para los sistemas con enzima libre, se proponen los modelos cinéticos y se selecciona el que mejor se ajuste a los datos experimentales; de esta manera se da cumplimiento al objetivo 2 planteado al comienzo de este capítulo.

#### 3.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos

Los experimentos previos permitieron determinar las condiciones de operación, las cuales fueron; un sistema donde el agua proviene del preparado de la enzima comercial (6 %v/v de agua), y otro el que se añade agua hasta el 10 %v/v. Ambos sistemas operan en un intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, concentración inicial de

ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, concentración de enzima de 2 g·L<sup>-1</sup> y velocidad de agitación de 720 rpm. La Tabla 3.1 muestra los experimentos realizados, mientras que las Tablas 3.2 a 3.5 muestran los datos experimentales a una concentración de agua del 6 % v/v, y, en las Tablas 3.6 a 3.9, los datos experimentales a una concentración de 10 %v/v.

**Tabla 3.1.** Experimentos realizados para el sistema con enzima libre (CALB-L) en ausencia de disolvente orgánico, sin y con agua añadida

<b>Experimento</b>	<b>C<sub>w</sub> (% v/v)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>C<sub>10</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>
S1E1	6	50	20
S1E2	6	50	60
S1E3	6	50	100
S1E4	6	60	20
S1E5	6	60	60
S1E6	6	60	100
S1E7	6	70	20
S1E8	6	70	60
S1E9	6	70	100
S1E10	6	80	20
S1E11	6	80	60
S1E12	6	80	100
S1E13	10	50	20
S1E14	10	50	60
S1E15	10	50	100
S1E16	10	60	20
S1E17	10	60	60
S1E18	10	60	100
S1E19	10	70	20
S1E20	10	70	60
S1E21	10	70	100
S1E22	10	80	20
S1E23	10	80	60
S1E24	10	80	100

**Tabla 3.2.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 6 %v/v de agua a 50 °C

	<b>S1E1</b> <b>C<sub>10</sub>= 20 g·L<sup>-1</sup> T=50 °C</b>		<b>S1E2</b> <b>C<sub>10</sub>= 60 g·L<sup>-1</sup> T=50 °C</b>		<b>S1E3</b> <b>C<sub>10</sub>= 100 g·L<sup>-1</sup> T=50 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.100	0.010	0.050	0.015	0.040	0.019
20	0.190	0.018	0.080	0.023	0.060	0.029
30	0.260	0.025	0.120	0.035	0.090	0.044
40	0.330	0.032	0.150	0.044	0.110	0.053
60	0.440	0.043	0.210	0.061	0.160	0.078
90	0.560	0.054	0.310	0.090	0.230	0.111
120	0.650	0.063	0.370	0.108	0.290	0.141
150	0.700	0.068	0.410	0.119	0.330	0.160
180	0.750	0.073	0.490	0.143	0.390	0.189
240	0.840	0.081	0.580	0.169	0.480	0.233
300	0.890	0.086	0.650	0.189	0.540	0.262
360	0.900	0.087	0.710	0.207	0.590	0.286

**Tabla 3.3.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 6 %v/v de agua a 60 °C

	<b>S1E4</b> <b>C<sub>10</sub>= 20 g·L<sup>-1</sup> T=60 °C</b>		<b>S1E5</b> <b>C<sub>10</sub>= 60 g·L<sup>-1</sup> T=60 °C</b>		<b>S1E6</b> <b>C<sub>10</sub>= 100 g·L<sup>-1</sup> T=60 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.160	0.016	0.070	0.020	0.090	0.044
20	0.280	0.027	0.130	0.038	0.150	0.073
30	0.380	0.037	0.180	0.052	0.190	0.092
40	0.460	0.045	0.240	0.070	0.220	0.107
60	0.590	0.057	0.320	0.093	0.290	0.141
90	0.720	0.070	0.440	0.128	0.390	0.189
120	0.790	0.077	0.540	0.157	0.460	0.223
150	0.830	0.080	0.600	0.175	0.560	0.271
180	0.870	0.084	0.650	0.189	0.600	0.291
240	0.860	0.083	0.740	0.215	0.610	0.296
300	0.910	0.088	0.780	0.227	0.700	0.339
360	0.880	0.085	0.830	0.241	0.760	0.368

**Tabla 3.4.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 6 %v/v de agua a 70 °C

	<b>S1E7</b> <b>C<sub>10</sub>= 20 g·L<sup>-1</sup> T=70 °C</b>		<b>S1E8</b> <b>C<sub>10</sub>= 60 g·L<sup>-1</sup> T=70 °C</b>		<b>S1E9</b> <b>C<sub>10</sub>= 100 g·L<sup>-1</sup> T=70 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.320	0.031	0.150	0.044	0.130	0.063
20	0.500	0.048	0.270	0.079	0.210	0.102
30	0.580	0.056	0.350	0.102	0.290	0.141
40	0.590	0.057	0.390	0.113	0.330	0.160
60	0.650	0.063	0.490	0.143	0.410	0.199
90	0.730	0.071	0.630	0.183	0.520	0.252
120	0.740	0.072	0.680	0.198	0.580	0.281
150	0.790	0.077	0.740	0.215	0.660	0.320
180	0.800	0.078	0.770	0.224	0.690	0.334
240	0.820	0.080	0.810	0.236	0.750	0.364
300	0.840	0.081	0.840	0.244	0.800	0.388
360	0.860	0.083	0.850	0.247	0.830	0.402

**Tabla 3.5.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 6 %v/v de agua a 80 °C

	<b>S1E10</b> <b>C<sub>10</sub>= 20 g·L<sup>-1</sup> T=80 °C</b>		<b>S1E11</b> <b>C<sub>10</sub>= 60 g·L<sup>-1</sup> T=80 °C</b>		<b>S1E12</b> <b>C<sub>10</sub>= 100 g·L<sup>-1</sup> T=80 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.360	0.035	0.170	0.049	0.110	0.053
20	0.540	0.052	0.290	0.084	0.200	0.097
30	0.650	0.063	0.390	0.113	0.280	0.136
40	0.730	0.071	0.480	0.140	0.350	0.170
60	0.790	0.077	0.600	0.175	0.460	0.223
90	0.820	0.080	0.700	0.204	0.580	0.281
120	0.830	0.080	0.770	0.224	0.650	0.315
150	0.840	0.081	0.790	0.230	0.710	0.344
180	0.840	0.081	0.810	0.236	0.750	0.364
240	0.840	0.081	0.830	0.241	0.790	0.383
300	0.840	0.081	0.840	0.244	0.810	0.393
360	0.840	0.081	0.840	0.244	0.820	0.398

**Tabla 3.6.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 10 %v/v de agua a 50°C

	<b>S1E13</b> <b>CI0= 20 g·L<sup>-1</sup> T=50 °C</b>		<b>S1E14</b> <b>CI0= 60 g·L<sup>-1</sup> T=50 °C</b>		<b>S1E15</b> <b>CI0= 100 g·L<sup>-1</sup> T=50 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.100	0.010	0.050	0.015	0.055	0.027
20	0.190	0.018	0.080	0.023	0.090	0.044
30	0.260	0.025	0.120	0.035	0.120	0.058
40	0.330	0.032	0.150	0.044	0.140	0.068
60	0.440	0.043	0.210	0.061	0.160	0.078
90	0.560	0.054	0.310	0.090	0.230	0.111
120	0.650	0.063	0.370	0.108	0.280	0.136
150	0.700	0.068	0.410	0.119	0.290	0.141
180	0.750	0.073	0.490	0.143	0.360	0.175
240	0.840	0.081	0.580	0.169	0.470	0.228
300	0.890	0.086	0.650	0.189	0.510	0.247
360	0.900	0.087	0.710	0.207	0.550	0.267

**Tabla 3.7.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 10 %v/v de agua a 60 °C

	<b>S1E16</b> <b>CI0= 20 g·L<sup>-1</sup> T=60 °C</b>		<b>S1E17</b> <b>CI0= 60 g·L<sup>-1</sup> T=60 °C</b>		<b>S1E18</b> <b>CI0= 100 g·L<sup>-1</sup> T=60 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>X<sub>MG</sub></b>	<b>C<sub>MG</sub> (mol L<sup>-1</sup>)</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.160	0.016	0.070	0.020	0.080	0.039
20	0.280	0.027	0.130	0.038	0.100	0.048
30	0.380	0.037	0.180	0.052	0.120	0.058
40	0.460	0.045	0.240	0.070	0.160	0.078
60	0.590	0.057	0.320	0.093	0.230	0.111
90	0.720	0.070	0.440	0.128	0.330	0.160
120	0.790	0.077	0.540	0.157	0.380	0.184
150	0.830	0.080	0.600	0.175	0.450	0.218
180	0.870	0.084	0.650	0.189	0.520	0.252
240	0.860	0.083	0.740	0.215	0.590	0.286
300	0.910	0.088	0.780	0.227	0.700	0.339
360	0.880	0.085	0.830	0.241	0.720	0.349

**Tabla 3.8.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 10 %v/v de agua a 70 °C

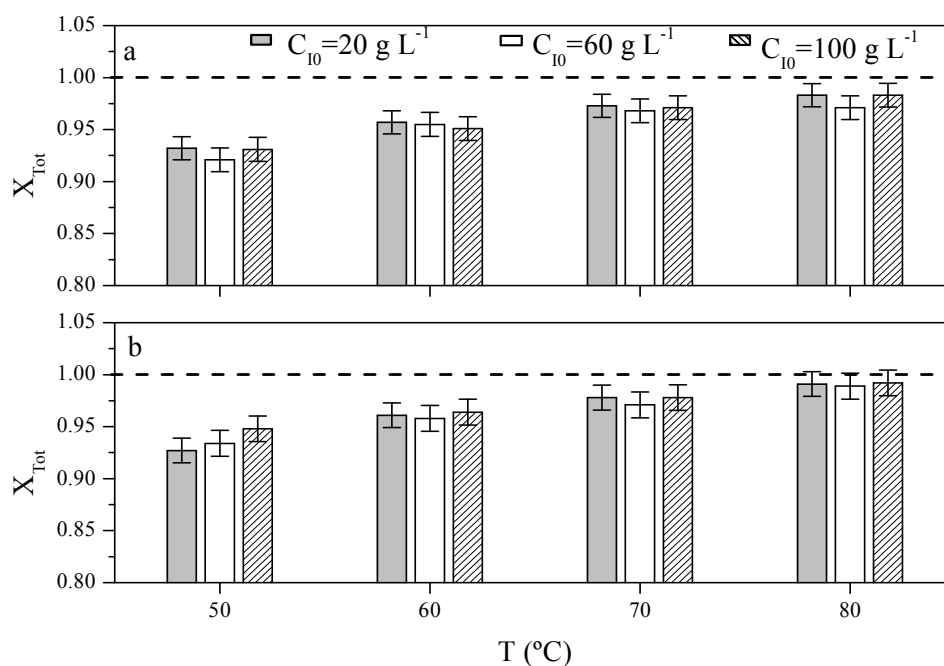
	<b>S1E19</b> <b><math>C_{10}= 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}</math> T=70 °C</b>		<b>S1E20</b> <b><math>C_{10}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}</math> T=70 °C</b>		<b>S1E21</b> <b><math>C_{10}= 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}</math> T=70 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b><math>X_{MG}</math></b>	<b><math>C_{MG} (\text{mol L}^{-1})</math></b>	<b><math>X_{MG}</math></b>	<b><math>C_{MG} (\text{mol L}^{-1})</math></b>	<b><math>X_{MG}</math></b>	<b><math>C_{MG} (\text{mol L}^{-1})</math></b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.240	0.023	0.110	0.032	0.070	0.034
20	0.440	0.043	0.200	0.058	0.130	0.063
30	0.530	0.051	0.280	0.081	0.190	0.092
40	0.620	0.060	0.350	0.102	0.240	0.116
60	0.740	0.072	0.460	0.134	0.330	0.160
90	0.810	0.079	0.590	0.172	0.440	0.213
120	0.840	0.081	0.660	0.192	0.520	0.252
150	0.860	0.083	0.720	0.209	0.590	0.286
180	0.870	0.084	0.770	0.224	0.650	0.315
240	0.870	0.084	0.810	0.236	0.730	0.354
300	0.890	0.086	0.840	0.244	0.760	0.368
360	0.880	0.085	0.850	0.247	0.800	0.388

**Tabla 3.9.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno al 10 %v/v de agua a 80 °C

	<b>S1E22</b> <b><math>C_{10}= 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}</math> T=80 °C</b>		<b>S1E23</b> <b><math>C_{10}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}</math> T=80 °C</b>		<b>S1E24</b> <b><math>C_{10}= 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}</math> T=80 °C</b>	
<b>Tiempo (min)</b>	<b><math>X_{MG}</math></b>	<b><math>C_{MG} (\text{mol L}^{-1})</math></b>	<b><math>X_{MG}</math></b>	<b><math>C_{MG} (\text{mol L}^{-1})</math></b>	<b><math>X_{MG}</math></b>	<b><math>C_{MG} (\text{mol L}^{-1})</math></b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.360	0.035	0.170	0.049	0.110	0.053
20	0.540	0.052	0.320	0.093	0.200	0.097
30	0.650	0.063	0.390	0.113	0.300	0.145
40	0.730	0.071	0.480	0.140	0.350	0.170
60	0.790	0.077	0.600	0.175	0.460	0.223
90	0.820	0.080	0.740	0.215	0.620	0.301
120	0.830	0.080	0.770	0.224	0.650	0.315
150	0.840	0.081	0.820	0.239	0.710	0.344
180	0.840	0.081	0.810	0.236	0.780	0.378
240	0.840	0.081	0.830	0.241	0.790	0.383
300	0.840	0.081	0.840	0.244	0.810	0.393
360	0.840	0.081	0.860	0.250	0.840	0.407

### 3.2.2.- Formulación de modelos cinéticos

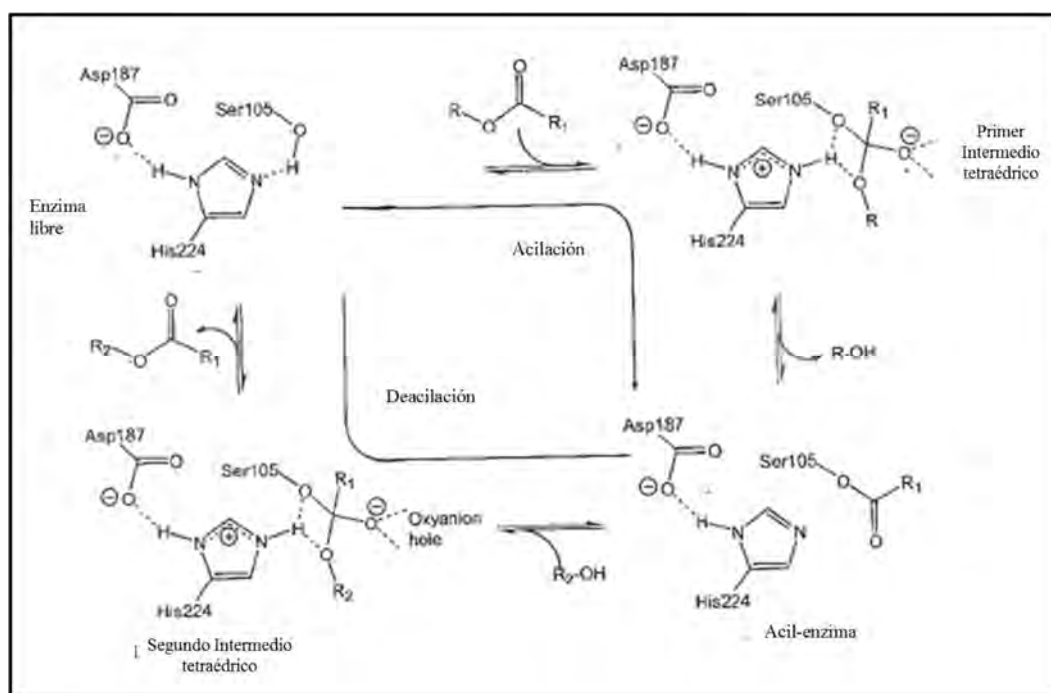
Se han propuesto varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno. Para seleccionar el más adecuado, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, comparándolos y discriminando entre ellos según criterios físicos y estadísticos. Antes de la propuesta de modelos, se debe determinar si la conversión final ( $X_{Tot}$ ) de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno en todos los experimentos es total o no; es decir, si la reacción se puede considerar irreversible o no. La Figura 3.13 muestra las conversiones finales alcanzadas dentro del intervalo de temperatura de 50 a 80 °C y de concentraciones iniciales de ibuprofeno, de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, y con 6 %v/v y 10 %v/v de concentración de agua; para obtener estos datos, se deja que la reacción transcurra o progrese durante tres días (72 h), siendo determinada la conversión final con la ecuación [2.3]. Incluyendo el error experimental, la conversión final de la esterificación de glicerina con ibuprofeno alcanza valores del 92% al 98%. Al aumentar la conversión final con la temperatura, quiere decir que la reacción de esterificación es endotérmica. Estos resultados sugieren la reversibilidad de la reacción y, por lo tanto, la necesidad de incluir términos para la reacción inversa en cualquier modelo cinético considerado.



**Figura 3.13.** Conversión de equilibrio de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno a) 6 %v/v de agua y b) 10 %v/v de agua

En reacciones de esterificación o transesterificación catalizada por lipasas, el mecanismo Ping-Pong Bi-Bi es ampliamente usado (Leong y col., 2014; Yadav y col., 2010). Este mecanismo implica cuatro pasos secuenciales, como se esquematiza en la Figura 3.14, que se pueden clasificar en dos etapas:

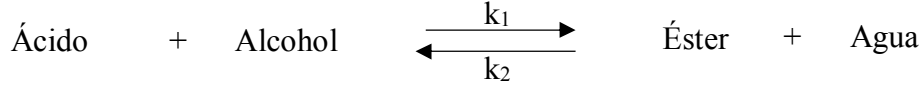
- Acilación:
  1. Formación del complejo enzima sustrato; este complejo orienta al sustrato dentro del centro activo de la enzima.
  2. Formación de un primer intermediario tetraédrico por interacción del ácido y posterior liberación de una molécula de agua.
- Desacilación:
  3. Descomposición del primer intermediario tetraédrico para generar el complejo acil-enzima.
  4. Incorporación de la molécula de alcohol para generar un segundo intermediario tetraédrico y posterior liberación del monoéster con el consecuente restablecimiento de la enzima a su estado original.



**Figura 3.14.** Mecanismo de una reacción de esterificación o transesterificación catalizada por CALB-L (Ottosson y col., 2001)



De manera general, el modelo al que da lugar el mecanismo “Ping-Pong Bi-Bi”, sin inhibición por productos o sustratos, para una reacción reversible viene dado por la ecuación [3.1](Imperial y col., 2014):



$$r = \frac{k_1 \cdot C_E \cdot \alpha \cdot \beta - k_2 \cdot C_E \cdot \pi \cdot \rho}{1 + \alpha + \beta + \pi + \rho + \alpha \cdot \beta + \alpha \cdot \pi + \beta \cdot \rho + \pi \cdot \rho} \quad [3.1]$$

$$\alpha = \frac{C_{\text{ácido}}}{K_{M,\text{ácido}}^*}; \beta = \frac{C_{\text{alcohol}}}{K_{M,\text{alcohol}}^*}; \pi = \frac{C_{\text{éster}}}{K_{\text{éster}}^*}; \rho = \frac{C_{\text{agua}}}{K_{M,\text{agua}}^*}$$

En el caso en estudio,  $C_{\text{alcohol}} \gg C_{\text{ácido}}$  por estar el alcohol (glicerina) en un gran exceso su concentración se considera constante, de igual manera,  $C_{\text{agua}} \gg C_{\text{éster}}$ , por tanto se puede considerar constante la concentración del agua, de forma que la ecuación [3.1] se puede simplificar a la ecuación [3.2], siendo una expresión más simple muy próxima al tipo Michaelis-Menten con un solo sustrato y producto sin inhibición por sustrato o producto.

$$r = \frac{k_1 \cdot C_E \cdot \alpha - k_2 \cdot C_E \cdot \pi}{1 + \alpha + \pi} \quad [3.2]$$

$$K_{\text{ácido}} = \frac{1}{K_{\text{ácido}}^*}; K_{\text{éster}} = \frac{1}{K_{\text{éster}}^*} \quad [3.3]$$

$$k_1' = \frac{k_1 \cdot C_E}{K_{\text{ácido}}^*}; k_2' = \frac{k_2 \cdot C_E}{K_{\text{éster}}^*} \quad [3.4]$$

Sustituyendo las ecuaciones [3.3] y [3.4] en la [3.2], queda la siguiente expresión

$$r = \frac{k_1' \cdot C_{\text{ácido}} - k_2' \cdot C_{\text{éster}}}{1 + K_{\text{ácido}} \cdot C_{\text{ácido}} + K_{\text{éster}} \cdot C_{\text{éster}}} \quad [3.5]$$

Las constantes cinéticas  $k_1'$  y  $k_2'$  son función de la temperatura, aceptando que dicha función sigue la ecuación [3.6], ecuación que deriva de la de Arrhenius. Esta ecuación tiene la ventaja de llevar siempre a un valor positivo de la constante al ajustarse a datos experimentales y, por otra parte, es más conveniente en regresiones no lineales por la menor diferencia de magnitud entre los dos términos del exponente.

$$k = \exp \left[ \ln k_o - \frac{E_{a,k}}{R \cdot T} \right] \quad [3.6]$$

A partir del modelo simple de Michaelis-Menten sin inhibición de sustrato y productos (ecuación [3.5]), se proponen los siguientes modelos cinéticos:

**Modelo 1:** Modelo potencial de pseudo-orden uno para ibuprofeno y monoéster, se considera que la enzima se encuentra saturada con la glicerina y el agua, ya que estos componentes tienen una alta concentración en el medio de reacción con respecto al ácido y al éster, como se ha dicho anteriormente.

**Modelo 2:** Considera un orden cero tanto para la glicerina como para el agua, por estar en gran exceso en comparación con el ibuprofeno y el monoéster. También, se considera que la concentración de ibuprofeno en la interfase líquida-líquida no influye, es de orden cero, debido a la transferencia del monoéster en la fase glicerina, que es donde ocurre la reacción (Jurado y col., 2008).

**Modelo 3:** Considera que hay más ibuprofeno disuelto en la fase glicerina, donde la reacción ocurre, y no en la interfase líquida-líquida, incluso si la enzima está localizada en tal interfase; por tanto, un orden uno es adaptado para el ibuprofeno y el monoéster. Además, considera la posibilidad de que la reacción ocurra en la interfase si el producto (monoéster) es capaz de dispersar o disolver al ibuprofeno, reduciendo la concentración de este compuesto en el entorno de la enzima (Jurado y col., 2008). En la Tabla 3.10 se muestran las ecuaciones de la velocidad para cada uno de los modelos propuestos.

**Tabla 3.10.** Ecuación de velocidad para los diferentes modelos cinéticos propuestos

Modelo	Ecuación cinética
1	$r = k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}$
2	$r = \frac{k'_1 - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
3	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$

### **3.2.3.- Selección del modelo cinético**

Como se explica en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos, se ha aplicado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden y el algoritmo de Marquardt-Levenberg para el ajuste de los modelos a los datos obtenidos. En primer lugar, se ajusta cada modelo a los datos experimento a experimento, con la finalidad de estimar constantes cinéticas y constantes de Michaelis-Menten, además de su evaluación en cuanto al sentido físico y estadístico de cada modelo cinético. Después, se ajustan los modelos a todos los datos experimentales incluyendo los obtenidos a diferentes temperaturas y concentraciones iniciales de ibuprofeno. Así se obtienen los resultados que se resumen en la Tabla 3.11. Para la discriminación y selección del más adecuado, se han considerados criterios físicos tradicionales junto con criterios estadísticos representativos (ver Tabla 3.12): error estándar (RMSE), parámetro F de Fisher (F95), suma de residuos al cuadrado (SQR), criterio de Akaike corregido (AICc) y criterio Bayesiano de información (BIC).

En la selección y discriminación de los modelos propuestos, el primer criterio físico considerado es el rango de valores de la energías de activación de la constante cinética, que se muestran en la Tabla 3.11; todas las constantes cinéticas tienen una energía de activación entre 35 y 75 kJ mol<sup>-1</sup>, dichos valores se encuentran dentro del intervalo de 2-200 kJ mol<sup>-1</sup> aceptado para la mayoría de los modelos cinéticos para reacciones químicas. Otro criterio aplicado fue el signo positivo en todas las constantes de adsorción o de equilibrio, que se alcanzó para todos los modelos propuestos. Por lo tanto, la discriminación de los modelos ha de ser realizado únicamente sobre la base de criterios estadísticos, ya que los criterios físicos se cumplen en todos los modelos. Ahora bien, el primer criterio estadístico considerado es el valor absoluto del error estándar (Tabla 3.11), este se mantiene constante para todas las constantes y parámetros de los modelos propuestos, excepto para el modelo 1 cuando el sistema tiene 10 %v/v de agua. Las constantes y parámetros del modelo 3 presentan los valores de error estándar más bajos, es decir, los valores están en el intervalo de confianza del 95%. Considerando el parámetro p para todos los modelos propuesto su valor es p<0.0001.

En cuanto a otros criterios estadísticos de discriminación (ver Tabla 3.12), los valores de RMSE, el criterio de información de Akaike (AICc) y el criterio de información bayesiano (BIC), los valores más bajos son los del Modelo 3 con 6 %v/v y

10 %v/v de agua, mientras que el valor F es el más alto para el mismo modelo para ambas concentraciones de agua.

**Tabla 3.11.** Valores físicos con error estándar para cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno

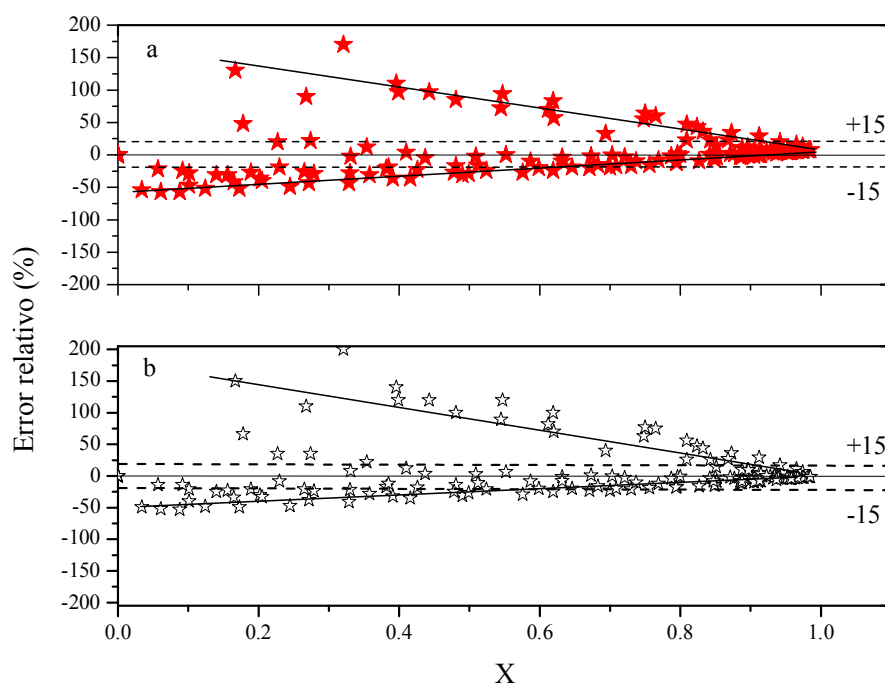
Modelo	Sistema con 6 % v/v de agua			Modelo	Sistema 10 % v/v de agua		
	Parámetro	Valor	Error		Parámetro	Valor	Error
1	$\ln k'_{10}$	8.41	1.18	1	$\ln k'_{10}$	12.59	1.71
	$E_{a_{k'1}/R}$	4367	398		$E_{a_{k'1}/R}$	5644	580
	$\ln k'_{20}$	2.78	4.40		$\ln k'_{20}$	8.91	9.27
	$E_{a_{k'2}/R}$	3166	1491		$E_{a_{k'2}/R}$	5187	3180
2	$\ln k'_{10}$	10.88	0.53	2	$\ln k'_{10}$	16.48	1.10
	$E_{a_{k'1}/R}$	4875	175		$E_{a_{k'1}/R}$	6496	350
	$\ln k'_{20}$	11.21	0.66		$\ln k'_{20}$	18.36	1.48
	$E_{a_{k'2}/R}$	4974	175		$E_{a_{k'2}/R}$	7149	490
	$K_{MG}$	24.51	2.14		$K_{MG}$	40.19	8.37
3	$\ln k'_{10}$	<b>6.71</b>	<b>2.25</b>	3	$\ln k'_{10}$	<b>15.37</b>	<b>0.49</b>
	$E_{a_{k'1}/R}$	<b>4612</b>	<b>110</b>		$E_{a_{k'1}/R}$	<b>5891</b>	<b>151</b>
	$\ln k'_{20}$	<b>10.40</b>	<b>0.33</b>		$\ln k'_{20}$	<b>21.79</b>	<b>4.91</b>
	$E_{a_{k'2}/R}$	<b>4305</b>	<b>767</b>		$E_{a_{k'2}/R}$	<b>9036</b>	<b>1710</b>
	$K_I$	<b>5.82</b>	<b>0.57</b>		$K_I$	<b>30.15</b>	<b>5.81</b>
	$K_{MG}$	<b>23.30</b>	<b>1.68</b>		$K_{MG}$	<b>41.51</b>	<b>8.39</b>

**Tabla 3.12.** Valores estadísticos de cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno

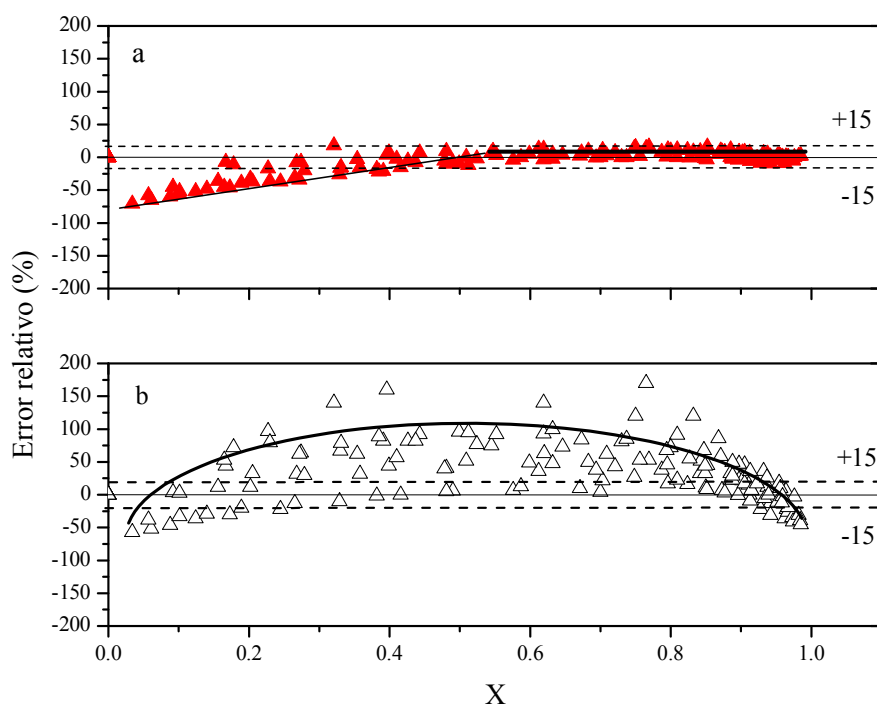
Sistema	Modelo	F-Fisher	N <sub>dexp</sub>	K	SQR	AICc	BIC	RMSE
Con 6 %v/v agua	1	2317	198	4	1.78	-924	-4.6	0.095
	2	13851	198	5	0.24	-1319	-6.6	0.035
	<b>3</b>	<b>25552</b>	<b>198</b>	<b>6</b>	<b>0.11</b>	<b>-1472</b>	<b>-7.3</b>	<b>0.024</b>
Con 10 %v/v agua	1	1138	156	4	2.34	-647	-4.1	0.122
	2	3660	156	5	0.59	-859	-5.4	0.062
	<b>3</b>	<b>10385</b>	<b>156</b>	<b>6</b>	<b>0.17</b>	<b>-1048</b>	<b>-6.6</b>	<b>0.033</b>

En las Figuras 3.15 a 3.17, se muestran los errores relativos de los modelos propuestos *versus* la conversión de ibuprofeno, para todos los datos de los experimentos realizados. El error experimental se estima en el intervalo de 15-20%, como puede observarse en la Figura 3.15 a y b, el modelo 1 con 6 %v/v y 10 %v/v, presenta una tendencia decreciente del error relativo con respecto a la conversión, indicando que a valores de conversión por debajo de 0,8 el error absoluto de los datos experimentales y los datos ajustados son menores y, por ende, mayores su varianza, mientras que por encima de este valor el error absoluto es mayor y la varianza es menor.

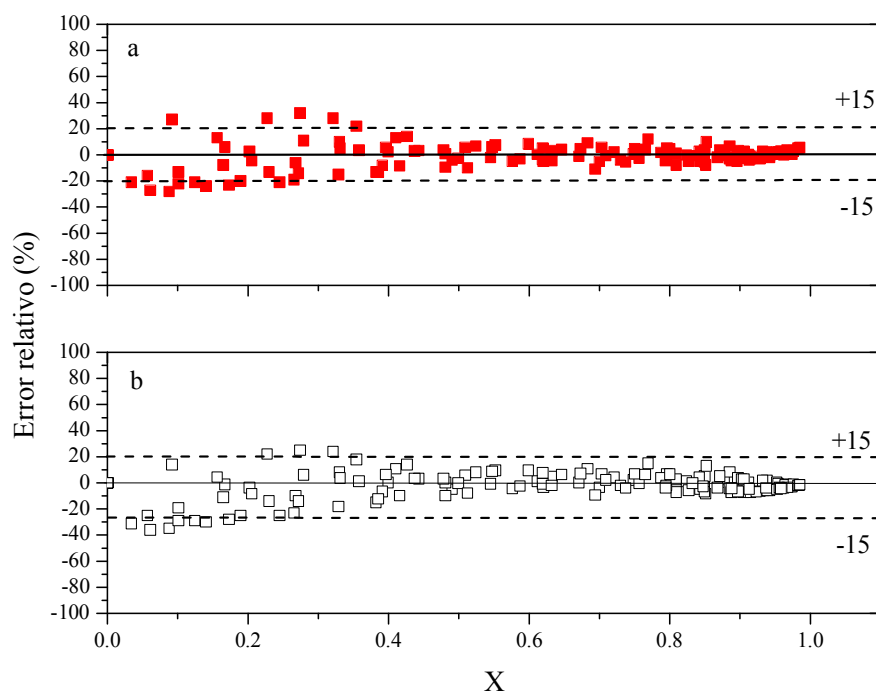
Por otra parte, para el modelo 2, en la Figura 3.16a, se observa que a valores de conversión por debajo de 0,5, el error relativo tiene tendencia creciente con respecto a la conversión hasta 0,5; en consecuencia, los valores del error absoluto son pequeños y por tanto, mayor varianza entre los datos experimentales y los datos ajustados. Valores de conversión por encima de 0,5 lleva a desviaciones bajas, estando el error relativo dentro de los límites del error experimental (líneas punteadas). En la Figura 3.16b, para todos los valores de conversión, hay una tendencia parabólica en el error relativo, por consiguiente la varianza entre los datos experimentales y los ajustados son mayores. En la Figura 3.17 a y b, se puede observar que el modelo 3, conduce a desviaciones bajas y no existe una tendencia del error relativo con respecto a la conversión, estando el error casi dentro de los límites del error experimental en ambos sistemas con 6 %v/v y 10 %v/v. Por lo tanto, el modelo 3 tiene una excelente bondad del ajuste en los intervalos estrechos para las constantes cinéticas, al igual que los otros parámetros estadísticos, y es el modelo elegido para describir la evolución de este sistema.



**Figura 3.15.** Error relativo *versus* la conversión para Modelo 1 potencial pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster a) 6 %v/v de agua y b) 10 %v/v de agua



**Figura 3.16.** Error relativo *versus* la conversión para Modelo 2 hiperbólico pseudo-orden cero para el ibuprofeno y pseudo-orden 1 para el monoéster a) 6 %v/v de agua y b) 10 %v/v de agua



**Figura 3.17.** Error relativo *versus* la conversión para el Modelo 3 hiperbólico pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y el monoéster a) 6 %v/v de agua y b) 10 %v/v de agua

Como se ha mencionado anteriormente, la adición de agua disminuye el efecto que sobre la velocidad global tendría la transferencia de materia y, en general, cualquier fenómeno físico que afecte a la concentración de sustrato disponible para el centro activo de la enzima. De hecho, comparando los valores de energía de activación para el sistema con 6 %v/v y 10 %v/v, la energía de activación de la reacción directa aumenta de 37 kJ mol<sup>-1</sup> a 48 kJ mol<sup>-1</sup>, mientras que, para la reacción inversa varía de 35 kJ mol<sup>-1</sup> a 75 kJ mol<sup>-1</sup>. Por tanto, la presencia de una concentración agua  $\geq 10$  %v/v aumenta la velocidad global de reacción. Este hecho se refleja también en los cambios en los valores de las constantes del denominador de la ecuación cinética,  $K_I$  y  $K_{MG}$ ; estas constantes son inversas a las constantes de Michaelis-Menten para el ibuprofeno y su monoéster, respectivamente (ecuación [3.3]). Por tanto, la disponibilidad de sustrato para su transformación por parte de la lipasa es mayor en presencia del 10 %v/v de agua.

Las Figuras 3.18 a 3.21 muestran el ajuste del Modelo 3 a los datos experimentales para todas las concentraciones iniciales de ibuprofeno y todas las temperaturas estudiadas y para ambos conjuntos de experimentos, con 6 %v/v y 10 %v/v de contenido de agua, evidenciando su adecuación en el intervalo de condiciones experimentales estudiado; puede apreciarse bajos errores o desviaciones absolutas observados entre los datos experimentales (puntos dispersos) y las líneas que muestran los datos calculados por los modelos seleccionados. Se puede afirmar que la selección de este modelo para ambos sistemas, junto con la solubilidad del ibuprofeno en glicerina, sugiere que la reacción se lleva a cabo principalmente en la fase de glicerina y que la enzima está saturada con agua y glicerina, siendo las concentraciones de ibuprofeno y monoéster las variables consideradas en el ajuste.

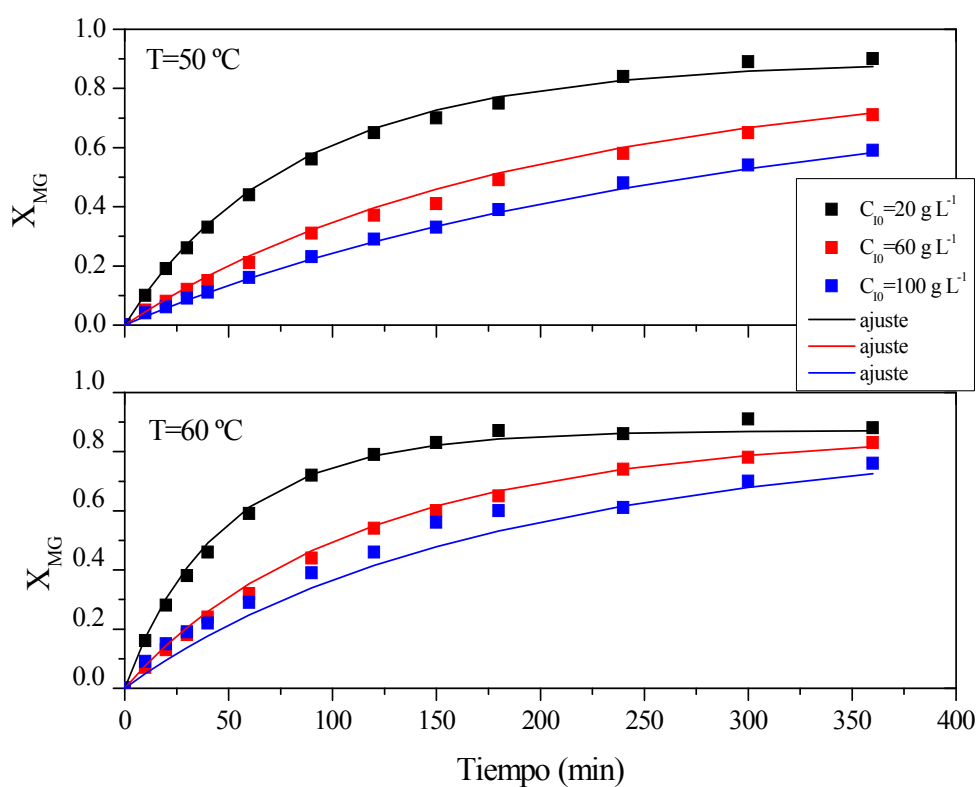
Todo lo anterior, el valor de los parámetros, de los errores típicos de constantes y de la conversión en equilibrio, sugiere un modelo simple de Michaelis-Menten de una reacción reversible incluyéndola esterificación e hidrólisis, siendo de pseudo-cero orden para el glicerol y el agua. Por tanto, el mejor modelo de los propuestos, el modelo 3, queda representado por las ecuaciones [3.7] y [3.8] con el valor de los parámetros y sus intervalos de confianza.

#### Modelo 3 con 6 % v/v de agua

$$r = \frac{\exp\left[6,71 \pm 2,25 - \frac{4612 \pm 110}{T}\right] \cdot C_I - \exp\left[10,40 \pm 0,33 - \frac{4305 \pm 767}{T}\right] \cdot C_{MG}}{1 + (5,82 \pm 0,57) \cdot C_I + (23,03 \pm 1,68) \cdot C_{MG}} \quad [3.7]$$

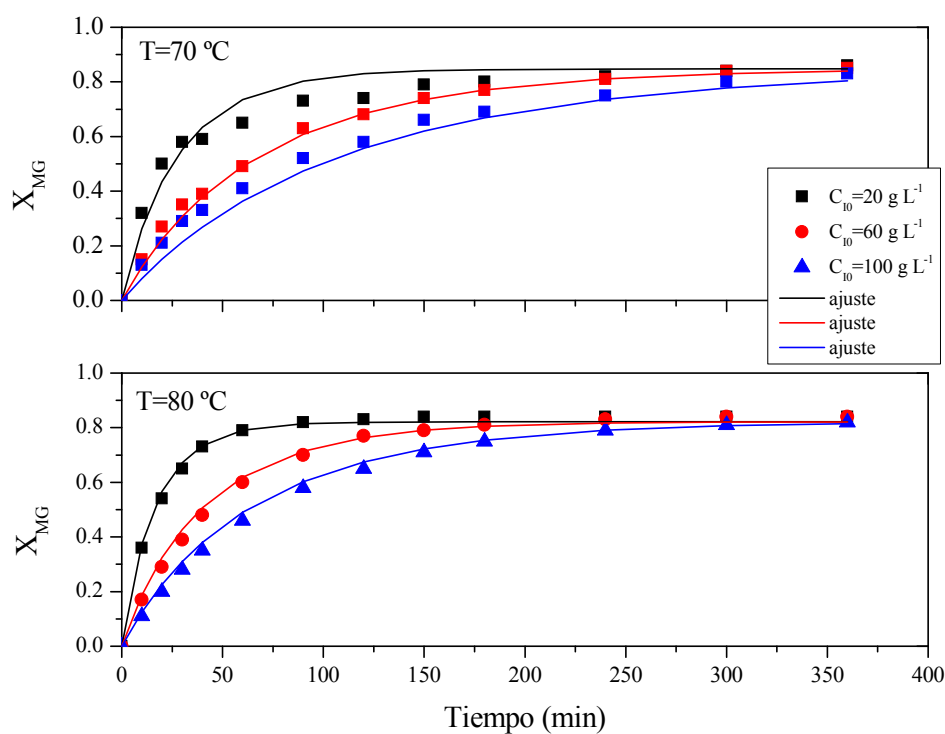
**Modelo 3 con 10 % v/v de agua**

$$r = \frac{\exp\left[15,37 \pm 0,49 - \frac{5891 \pm 151}{T}\right] \cdot C_I - \exp\left[21,79 \pm 4,91 - \frac{9036 \pm 1710}{T}\right] \cdot C_{MG}}{1 + (30,15 \pm 5,81) \cdot C_I + (41,51 \pm 8,39) \cdot C_{MG}} \quad [3.8]$$

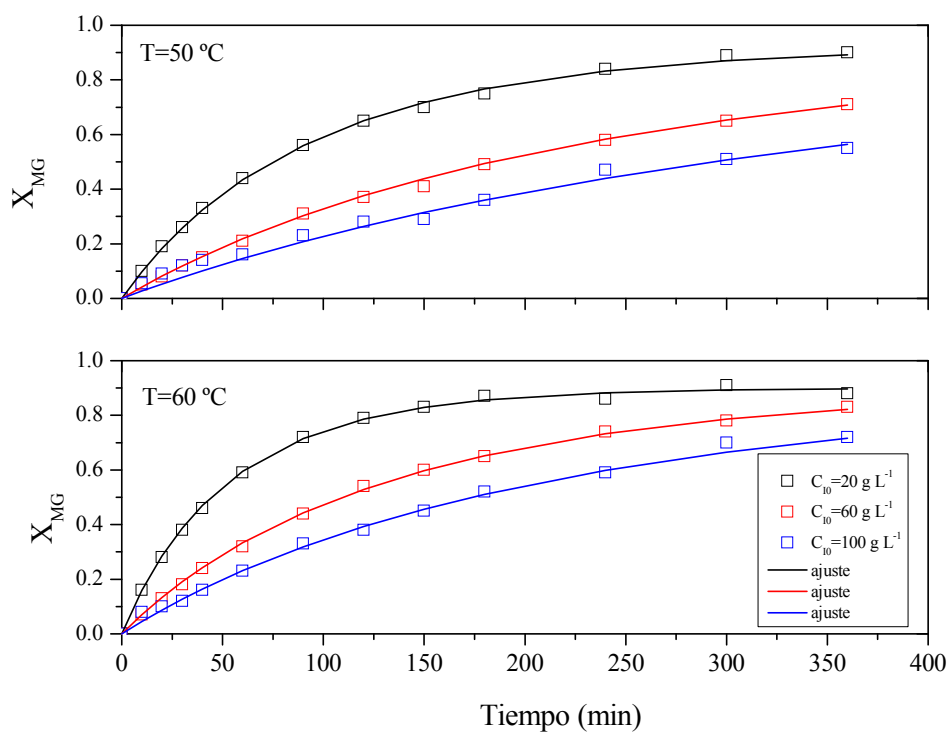


**Figura 3.18.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y el monoéster con 6 % v/v de agua, a temperaturas de 50 y 60 °C

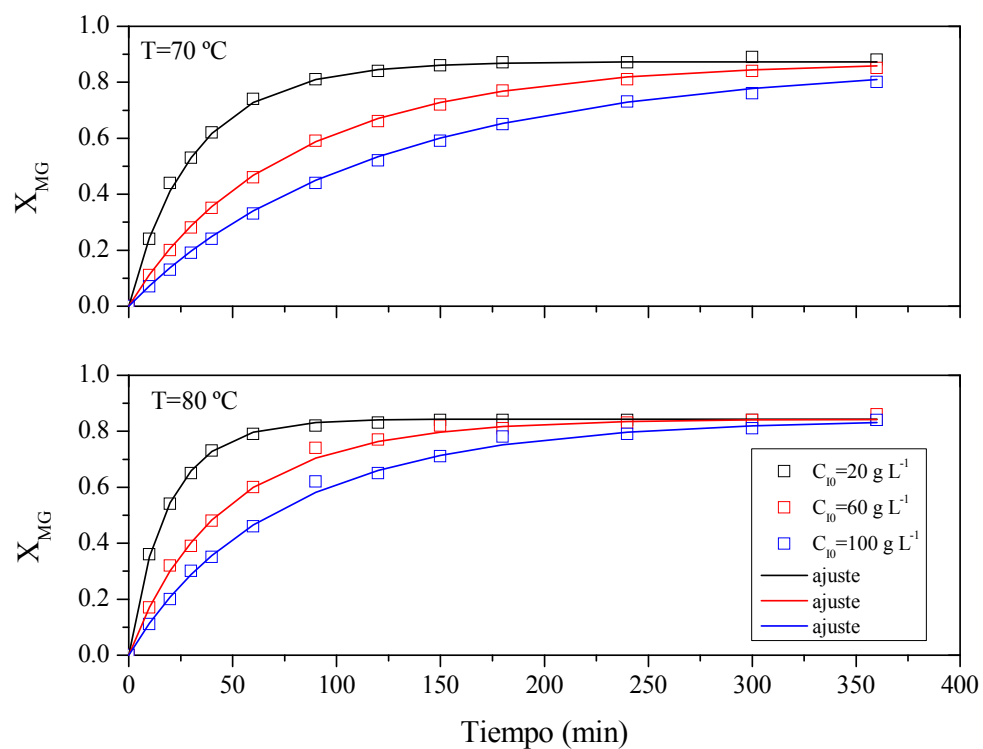




**Figura 3.19.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y el monoéster con 6 % v/v de agua, a temperaturas de 70 y 80 °C



**Figura 3.20.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y el monoéster con 10 % v/v de agua, a temperaturas de 50 y 60 °C



**Figura 3.21.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y el monoéster con 10 % v/v de agua, a temperaturas de 70 y 80 °C

### 3.3.- REFERENCIAS CITADAS

- Contesini, F. J. y P. de Oliveira Carvalho (2006). Esterification of (RS)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry* **17** (14): 2069-2073.
- Chavez-Flores, D. y J. M. Salvador (2012). Facile conversion of racemic ibuprofen to (S)-ibuprofen. *Tetrahedron-Asymmetry* **23** (3-4): 237-239.
- Esteban, J., E. Fuente, M. Gonzalez-Miquel, A. Blanco, M. Ladero y F. Garcia-Ochoa (2014). Sustainable joint solventless coproduction of glycerol carbonate and ethylene glycol via thermal transesterification of glycerol. *RSC Advances* **4** (95): 53206-53215.
- Foresti, M. L., M. Galle, M. L. Ferreira y L. E. Briand (2009). Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **84** (10): 1461-1473.
- Foresti, M. L., M. Pedernera, V. Bucalá y M. L. Ferreira (2007). Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. *Enzyme and Microbial Technology* **41** (1-2): 62-70.
- Fregolente, P. B. L., L. V. Fregolente, G. M. F. Pinto, B. C. Batistella, M. R. Wolf-Maciel y R. Maciel Filho (2008). Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer. 285-292.
- Garcia-Ochoa, F., A. Romero y V. Santos (1992). Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *International Journal Chemical Engineering* **32** (2): 538-551.
- Hartwig, R. y D. Houze (2009). Transdermal delivery of ketoprofen polar derivatives. *Google Patents*.
- Imperial, S. y J. J. Centelles (2014). Enzyme Kinetic Equations of Irreversible and Reversible Reactions in Metabolism. *Journal of Biosciences and Medicines* **2** (04): 24.
- Jurado, E., F. Camacho, G. Luzón, M. Fernández-Serrano y M. García-Román (2008). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions: Study of the initial rates and the reaction time course. *Biochemical Engineering Journal* **40** (3): 473-484.
- Kim, S. y J. Rhee (1991). Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **68** (7): 499-503.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-246.
- Ladero, M., M. de Gracia, F. Trujillo y F. Garcia-Ochoa (2012). Phenomenological kinetic modelling of the esterification of rosin and polyols. *Chemical Engineering Journal* **197**: 387-397.
- Leong, S., N. Y. Azudin y S. R. A. Shukor (2014). Process modeling of isoamyl acetate synthesis catalyzed by lipase from *Candida antarctica* in solvent-free system. *Journal of Engineering Science* **10** (59-71).
- Maxwell, R. y J. Chickos (2012). An examination of the thermodynamics of fusion, vaporization, and sublimation of ibuprofen and naproxen by correlation gas chromatography. *Journal of pharmaceutical sciences* **101** (2): 805-814.

- Morrone, R., N. D'Antona, D. Lambusta y G. Nicolosi (2010). Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65** (1–4): 49-51.
- Ong, A. L., A. H. Kamaruddin, S. Bhatia, W. S. Long, S. T. Lim y R. Kumari (2006). Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology* **39** (4): 924-929.
- Ottosson, J. y T. h. i. S. I. f. bioteknologi (2001). Enthalpy and Entropy in Enzyme Catalysis: A Study of Lipase Enantioselectivity. Tekniska högsk.
- Overmeyer, A., S. Schrader-Lippelt, V. Kasche y G. Brunner (1999). Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 C to 160 C in supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnology Letters* **21** (1): 65-69.
- Paiva, A. L., V. M. Balcão y F. X. Malcata (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **27** (3–5): 187-204.
- Prajapati, H. N., D. M. Dalrymple y A. T. Serajuddin (2012). A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development. *Pharmaceutical research* **29** (1): 285-305.
- Selmi, B., E. Gontier, F. Ergon y D. Thomas (1997). Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: lipase regiospecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. *Biotechnology Techniques* **11** (8): 543-547.
- Tamayo, J. (2014). Producción enzimática de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácido benzoico y  $\alpha$ -metoxicinámico. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Tamayo, J. J., M. Ladero, V. E. Santos y F. Garcia-Ochoa (2012). Esterification of benzoic acid and glycerol to  $\alpha$ -monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry* **47** (2): 243-250.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2010). Lipase-catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach. *Process Biochemistry* **45** (4): 586-592.

---

*Capítulo 4*  
**ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA  
CALB-L con COSOLVENTE**

---



#### **4.- ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO CATALIZADA POR LA ENZIMA CALB-L: PROCESO con COSOLVENTE**

La síntesis enzimática en un disolvente orgánico presenta diversas ventajas, tales como el incremento en la solubilidad de sustratos hidrofóbicos, el desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia los productos de esterificación y la facilidad de recuperación de las enzimas sin tener que ser inmovilizadas, entre otras (Idris y col., 2012). Por otra parte, dependiendo de la miscibilidad del disolvente orgánico con agua, la síntesis enzimática en un medio orgánico puede dividirse en cuatro tipos (Doukyu y col., 2010): agua-disolvente orgánico miscibles, sistemas micelares, medio orgánico anhidro y agua-disolvente orgánico inmiscibles. En estos sistemas, el contenido de agua es fundamental, debido a que las enzimas tienen que tener una hidratación mínima, que es fundamental para su actividad y estabilidad catalítica. Por tanto, cuando la enzima está en un medio orgánico, un cierto contenido de agua debe existir, para que la enzima pueda mantener su estructura (Klibanov, 2001).

El efecto de disolventes orgánicos ha sido estudiado en reacciones de transesterificación y esterificación catalizada por la enzima CALB. Se ha evaluado la actividad y estabilidad de la enzima libre e inmovilizada CALB en 2-butanona y o-xileno en la transesterificación del butirato de vinilo con alcohol nitrobenílico, alcanzando una actividad de la enzima libre CALB-L en o-xileno de 9 U/mg y 1,4 U/mg en 2-butanona de (Koops y col., 1999). Asimismo, en la transesterificación entre acetato de vinilo y 1-octanol, se ha estudiado el efecto de varios disolventes orgánicos (tolueno, 1,4 dioxano, tetracloruro de carbono) en la actividad de la enzima libre e inmovilizada CALB, consiguiendo valores de actividad total de transesterificación más altos en tolueno ( $0,472 \mu\text{mol min}^{-1}$ ) que en 1,4 dioxano ( $0,0981 \mu\text{mol min}^{-1}$ ) y tetracloruro de carbono ( $0,0587 \mu\text{mol min}^{-1}$ ) (Secundo y col., 2001). Asimismo, el efecto de diferentes solventes ha sido estudiado en la esterificación de ácido 2-arilpropiónico con propanol catalizada por la enzima inmovilizada CALB, obteniendo altos valores de la velocidad de esterificación cuando los disolvente son apolares ( $\text{Log } P > 2$ ) (Arroyo y col., 1994). De igual manera, el efecto de disolventes orgánicos en la esterificación enzimática con profenos ha sido considerada con flurbiprofeno (Duan y col., 1998), con naproxeno (Morrone y col., 2010) y con ibuprofeno (Kin y col., 1996; Zhao y col., 2005).

A continuación, se aborda el estudio de la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por enzima CALB-L en un medio orgánico, donde la glicerina actuará a la vez como reactivo y como disolvente. Es un sistema que se caracteriza por tener la enzima lipasa en disolución, por tanto, es un sistema bifásico ( $L_1$ - $L_2$ ), compuesto por una fase acuosa que contiene la enzima disuelta y otra fase compuesta por un disolvente inmiscible con agua, siendo la fase  $L_1$  está formada por la glicerina, mientras que  $L_2$  es la fase donde el ibuprofeno está disuelto en el cosolvente y la enzima libre CALB-L. Al igual que en el apartado anterior, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar las condiciones de operación adecuadas para llevar a cabo la reacción de esterificación de glicerina e ibuprofeno catalizada por la CALB-L en medio orgánico.
2. Proponer un modelo cinético que permita describir los resultados obtenidos. Para ello, después de formular diversos modelos, se procederá a seleccionar el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos, utilizando criterios físicos y estadísticos, como en el apartado anterior.

#### **4.1.- EXPERIMENTOS PREVIOS**

Para dar cumplimiento al primer objetivo se realizaron una serie de experimentos previos, analizando el efecto de las siguientes variables en la reacción de esterificación:

- Selección de cosolvente y solubilidad de ibuprofeno en dicho cosolvente.
- Efecto de la concentración de enzima.
- Efecto de la velocidad de agitación.
- Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno.
- Efecto de la concentración de agua.

##### **4.1.1.- Selección del cosolvente: Solubilidad de ibuprofeno en tolueno**

Se ha probado una serie de disolventes que permitan disolver al ibuprofeno y ser usados como medio orgánico (cosolvente) en la esterificación enzimática de la glicerina con el ibuprofeno; para ello, se ha determinado la solubilidad del ibuprofeno en distintos disolventes a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Figura 4.1; como se puede observar; la 2-butanona, el tolueno y el xileno son los disolventes que mejor disuelven al ibuprofeno. La 2-butanona no fue seleccionada debido a que tiene una



temperatura de ebullición muy próxima a la máxima temperatura de operación en la esterificación enzimática a estudiar: 80 °C (Ver Tabla 4.1).

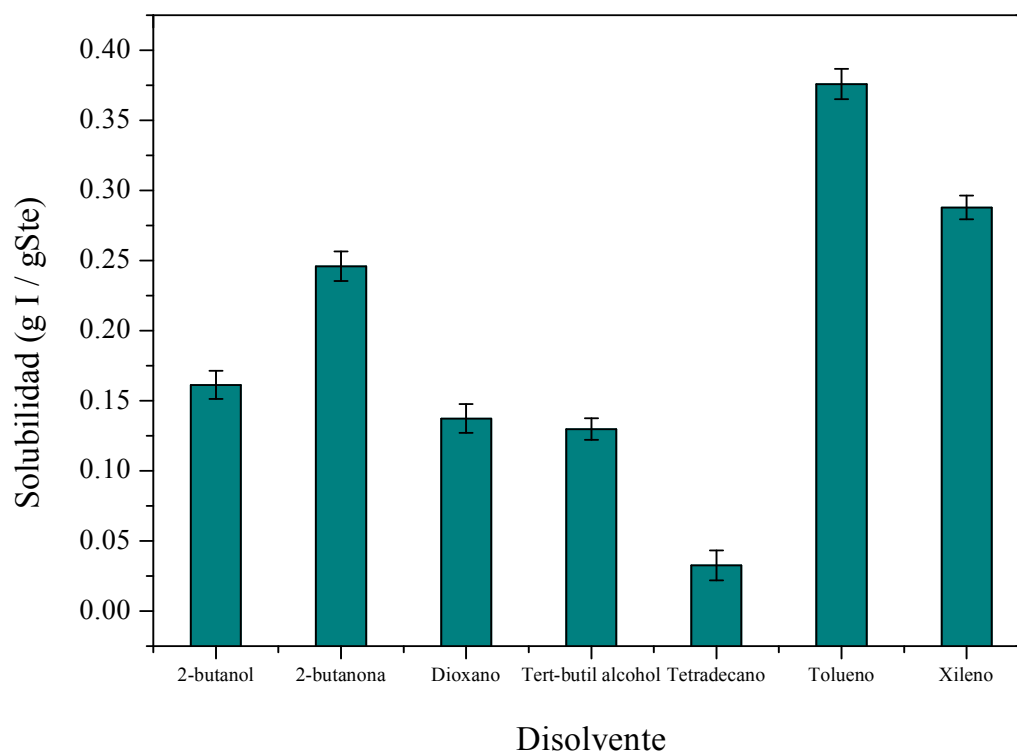
Por otra parte, es bien conocido que las enzimas en un medio orgánico pueden perder actividad y estabilidad. De manera general, el coeficiente de partición octanol/agua (Log P) se ha usado como una medida de la polaridad de los disolventes. Así, se ha podido comprobar que la actividad enzimática es baja en disolventes cuyo Log P < 2, moderada si  $2 < \text{Log P} < 4$ , y alta si el  $\text{Log P} > 4$  (Faber, 2011). Desde este punto de vista, el tolueno y el xileno pueden ser usados como medio orgánico; como se puede observar en la Tabla 4.1, los valores de Log P para el tolueno y xileno son 2,50 y 3,15, respectivamente.

Para seleccionar entre ambos disolventes, se han llevado a cabo experimentos de esterificación enzimática con una concentración inicial de ibuprofeno de  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  a una temperatura de 60 °C, volumen de ambos disolvente de 5 mL, volumen de glicerina de 20 mL y una concentración de enzima de  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Como se puede observar en la Figura 4.2, a tiempos < 300 min, la conversión al monoéster de ibuprofeno para el disolvente xileno y tolueno son prácticamente iguales, por encima de 300 min, es ligeramente mayor la conversión del monoéster en tolueno. Por lo tanto, se ha seleccionado el tolueno, que también es el que disuelve mejor al ibuprofeno. Además, en literatura se ha estudiado el efecto del tolueno en la enzima libre e inmovilizada de la CALB en la esterificación de profenos; por ejemplo, en la esterificación de naproxeno con propanol, en presencia de tolueno, se ha obtenido un 34% de conversión en la reacción usando la enzima inmovilizada Novozym 435 (Morrone y col., 2010); en la esterificación del flurbiprofeno con propanol catalizada por Novozym 435 en presencia de disolventes orgánicos, entre ellos el tolueno, se alcanzó un valor de conversión del 20%, siendo el valor más alto en comparación con los otros disolventes (Morrone y col., 1995). Igualmente, en literatura se ha evaluado la estabilidad térmica de la enzima CALB en tolueno, de esta manera fue determinada la actividad de la enzima libre CALB-L en la esterificación del 1-octanol con ácido láurico en isooctano, obteniendo una máxima actividad de esterificación a 40 °C, disminuyendo la actividad a medida que aumenta la temperatura hasta 90 °C, a esta temperatura, la enzima libre CALB no presentó actividad (Poojari y col., 2013). También se ha estudiado la flexibilidad en la estructura de la enzima CALB en diferentes disolventes, entre ellos el tolueno; la flexibilidad de la enzima CALB disminuye en presencia del disolvente orgánico en el siguiente orden: metanol, isopentano, cloroformo,

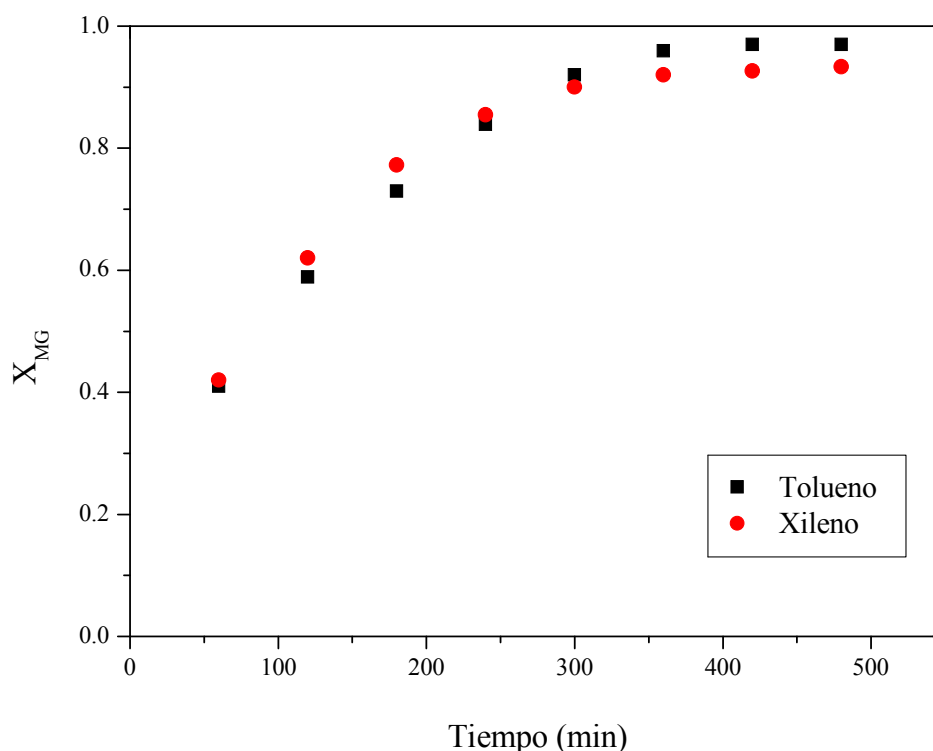
tolueno y ciclohexano, debido a las interacciones proteína-disolvente y por la formación del “spanning water network”, la capa de agua de hidratación que rodea a la proteína (Trodler y col., 2008).

**Tabla 4.1.** Coeficiente de partición y temperatura de ebullición de los distintos solventes

Disolvente	Coeficiente de partición (Log P)	Temperatura de ebullición (°C)
2-butanol	0.60	99.0
2-butanona	0.29	79.4
1,4 Dioxano	-0.27	101.1
Tert-butilalcohol	0.30	83.0
Tetradecano	-	253.5
Tolueno	2.50	110.6
Xileno	3.15	144.0

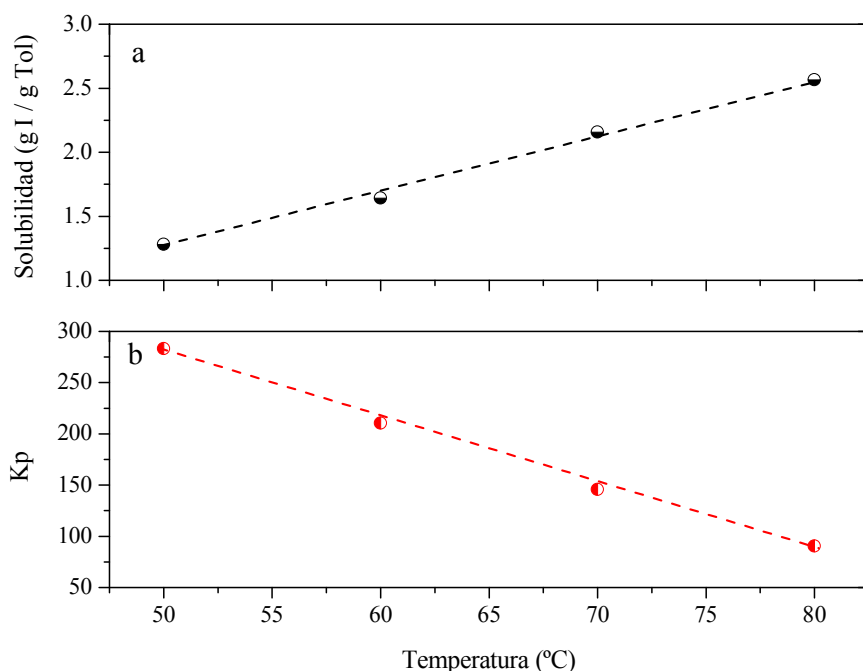


**Figura 4.1.** Solubilidad del ibuprofeno en distintos disolventes



**Figura 4.2.** Conversión del monoéster de ibuprofeno ( $X_{MG}$ ) *versus* tiempo de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB-L

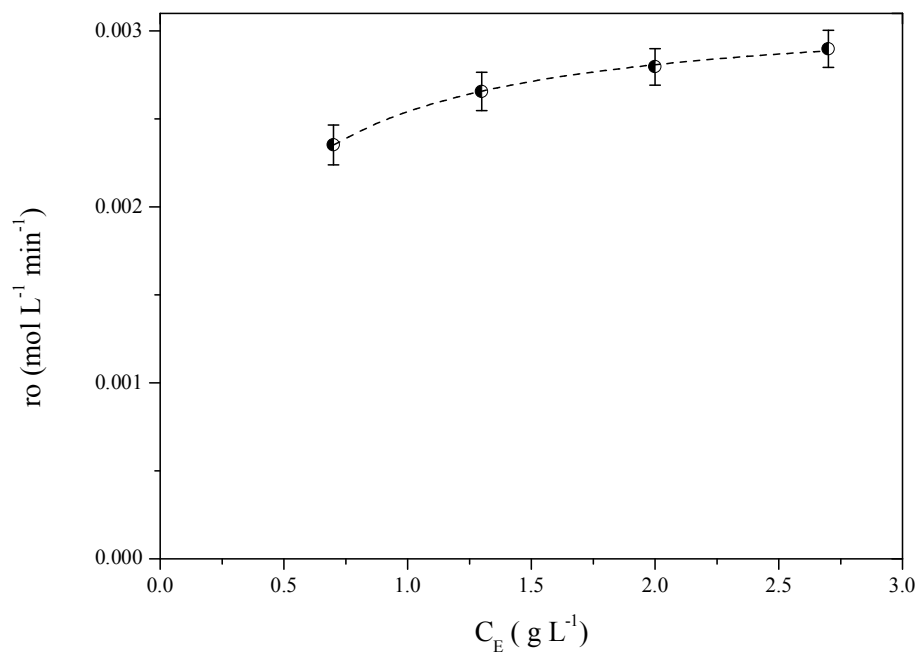
Una vez seleccionado el medio orgánico, se determinó la solubilidad del ibuprofeno (I) en tolueno (Tol) usando concentraciones iniciales de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup> y temperaturas entre 50 y 80 °C. En la Figura 4.3a se puede observar que la solubilidad del ibuprofeno en tolueno aumenta linealmente con el aumento de la temperatura, alcanza el valor de 2,56 g I/ g Tol a 80 °C. Por otra parte, se determinó la relación de partición del ibuprofeno ( $K_P$ ) entre dos disolventes inmiscibles (tolueno y glicerina), lo que se determina usando la ecuación [2.1]. En la Figura 4.3b, se muestra que el valor de  $K_P$  disminuye a medida que se aumenta la temperatura hasta 80 °C, indicando que el ibuprofeno se encuentra en mayor concentración en la fase tolueno que en la fase glicerina a una temperatura de 80 °C.



**Figura 4.3.** a) Solubilidad del ibuprofeno y tolueno en las condiciones de trabajo. b) Relación de partición del ibuprofeno entre el tolueno y glicerina.

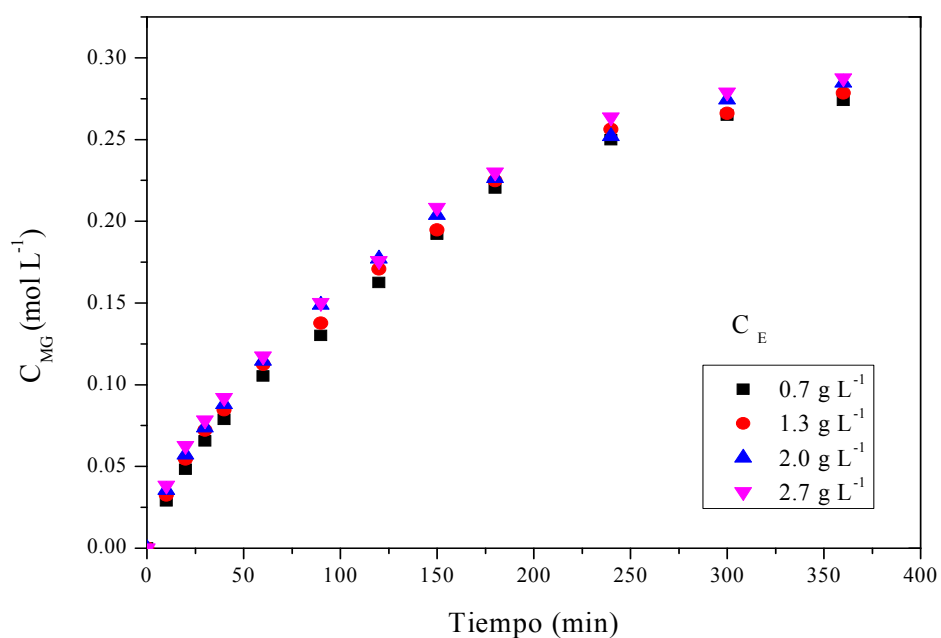
#### 4.1.2.- Efecto de la concentración de enzima

En la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno se estudió el efecto de la concentración de enzima entre 0,7 y 2,7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . En la Figura 4.4 se muestra la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración inicial de enzima ( $C_E$ ) empleada. Se puede observar que la velocidad inicial de esterificación aumenta con la concentración de enzima siguiendo una tendencia saturante. Este comportamiento es similar al observado en la esterificación de glicerina con ibuprofeno en un medio libre de solvente. Sin embargo, se puede afirmar como se presenta en la Figura 4.5, que no hay cambios significativos en la concentración del monoéster de ibuprofeno (MG) para valores por encima de una concentración de lipasa de 2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .



**Figura 4.4.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima CALB-L.

Condiciones: C<sub>I0</sub>=60 g·L<sup>-1</sup>; T=70 °C; N=720 rpm; Gli/Tol=20/5



**Figura 4.5.** Concentración de MG en función del tiempo de reacción a distintas concentraciones de enzima CALB-L.

Condiciones: C<sub>I0</sub>=60 g·L<sup>-1</sup>; T=70 °C; N=720 rpm; Gli/Tol=20/5

#### **4.1.3.- Efecto de la velocidad de agitación**

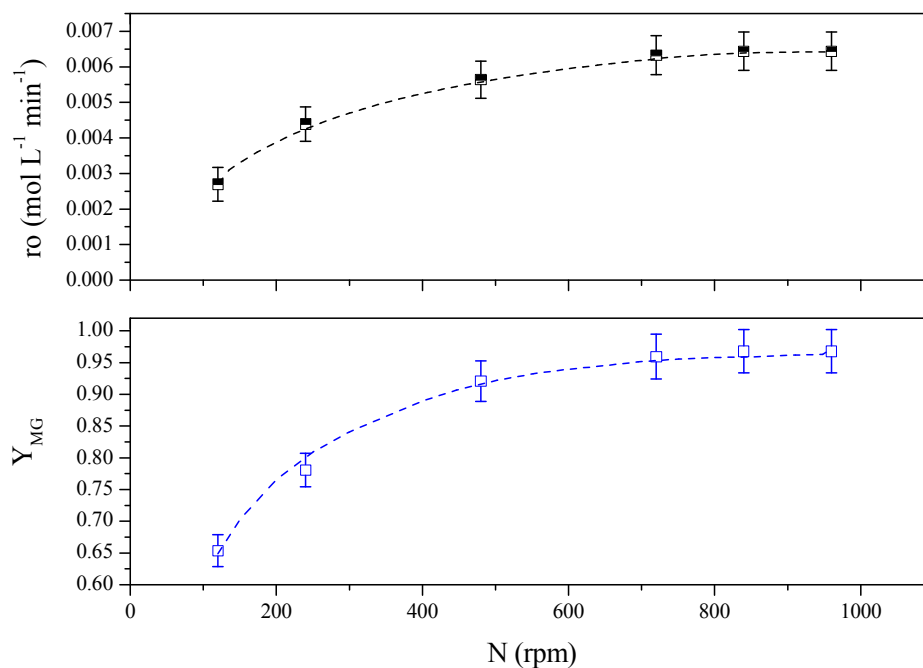
La influencia de la velocidad de agitación en la esterificación de glicerina con ibuprofeno en medio orgánico (tolueno) fue estudiada variando la velocidad de agitación entre 120 y 960 rpm. De esta manera se pretende comprobar la existencia de limitaciones de resistencia al transporte externo de materia. Como puede observarse en la Figura 4.6a, la velocidad inicial de esterificación aumenta con el aumento de la velocidad de agitación. A baja velocidad de agitación, el contacto entre las fases es deficiente, debido a que el tolueno es inmisible tanto en glicerina como en el agua presente en el medio de reacción, pero este contacto se incrementa hasta un punto donde no hay cambios significativos en la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno, para un valor de la agitación de 700 a 800 rpm.

En la Figura 4.6b, se puede observar que un incremento de la velocidad de agitación hasta 600 rpm produce un incremento en el rendimiento final del monoéster de ibuprofeno (MG); sin embargo, con un incremento adicional de la velocidad de agitación de 720 hasta 920 rpm, el rendimiento final del monoéster no presenta cambios significativos. Así, las posibles limitaciones del transporte de materia no son significativas a partir de 720 rpm, ya que la cantidad del monoéster de ibuprofeno (MG) formado es independiente de la velocidad de agitación. Por tanto, para establecer un buen contacto entre las fases presente se fija un valor de la velocidad de agitación de 720 rpm en la experimentación posterior.

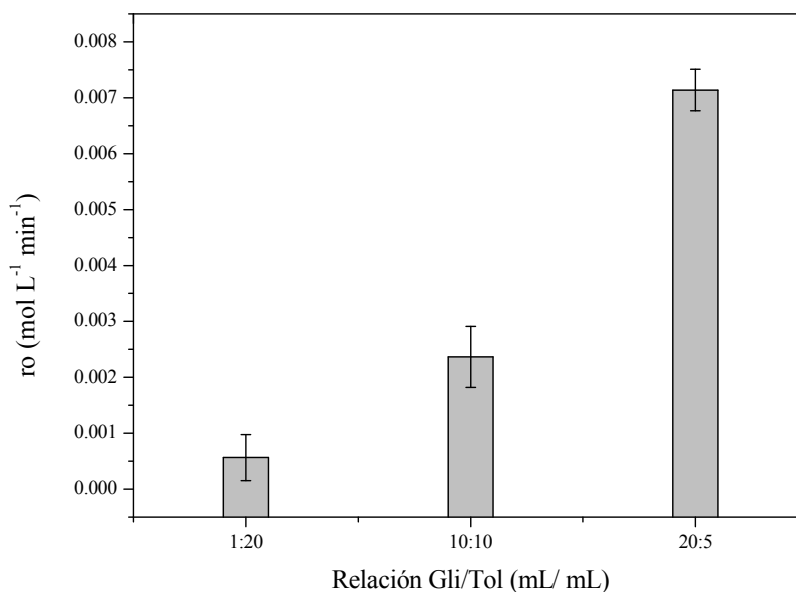
#### **4.1.4.- Relación glicerina- tolueno**

Se estudió el efecto de la relación glicerina-tolueno (Gli/Tol) en la esterificación de glicerina con ibuprofeno. Para ello, se experimentó con diferentes relaciones en volumen glicerina/tolueno: 1/20; 10/10 y 20/5. Como se puede observar en la Figura 4.7, para una relación de Gli/Tol=1/20 la velocidad inicial de esterificación es baja, pero aumenta a medida que aumenta la relación entre la glicerina y el tolueno. En este sentido, cuando hay menos cantidad de tolueno (5 mL) la enzima CALB no pierde su actividad catalítica en presencia de este disolvente, debido a que la fase acuosa formada por la glicerina y componentes del preparado enzimático de CALB-L forman una capa alrededor de la enzima y, por ende, se reduce el contacto directo de la enzima con el disolvente orgánico; este efecto ha sido descrito en la literatura por otros autores (Fregolente y col., 2008). Además, a alto valores de la relación Gli/Tol (20/5), se

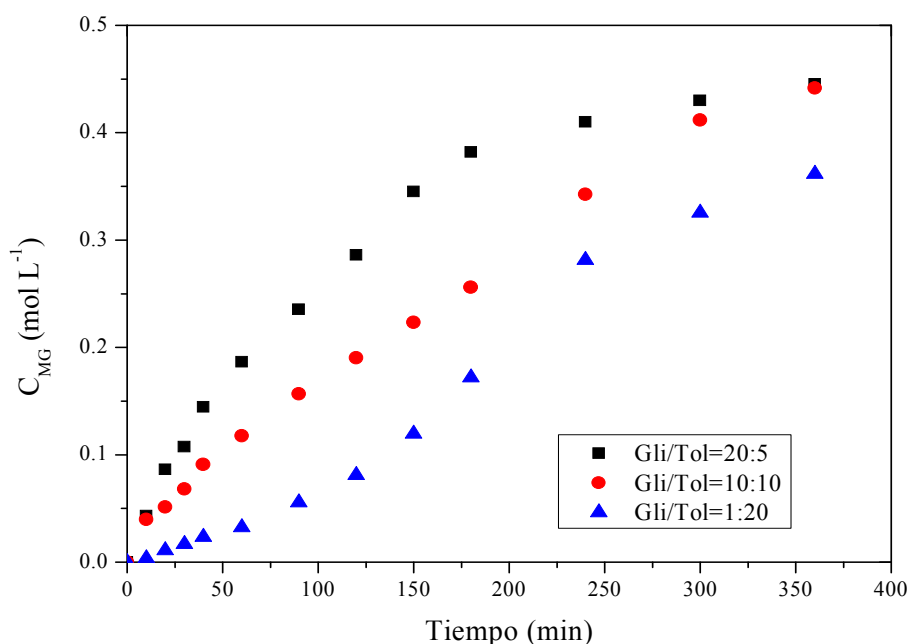
alcanzan valores altos en la concentración final del monoéster (Figura 4.8), siendo ésta la relación elegida para la realización de la experimentación posterior.



**Figura 4.6.** Efecto de la velocidad de agitación en: a) Velocidad inicial de esterificación. b) Rendimiento final de monoéster de ibuprofeno.  
Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Gli/Tol=20/5



**Figura 4.7.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno a distintas relaciones de Gli/Tol.  
Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $N=720 \text{ rpm}$



**Figura 4.8.** Concentración de monoéster de ibuprofeno ( $C_{MG}$ ) en función del tiempo de reacción a distintas relaciones Gli/Tol.  
Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $N=720 \text{ rpm}$

#### 4.1.5.- Estudio de posibles efectos de inhibición y de desactivación

Como se mencionó en el capítulo 3, al llevar a cabo la esterificación enzimática, la actividad de la enzima puede estar afectada por la presencia de inhibidores, ya sean productos o reactivos de esta reacción. Los efectos inhibidores pueden ser diferentes en presencia de un cosolvente; debido a esto, se ha realizado un estudio semejante al descrito en el capítulo 3, observando el efecto de la concentración de ibuprofeno, agua y temperatura en la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno cuando se emplea tolueno como cosolvente.

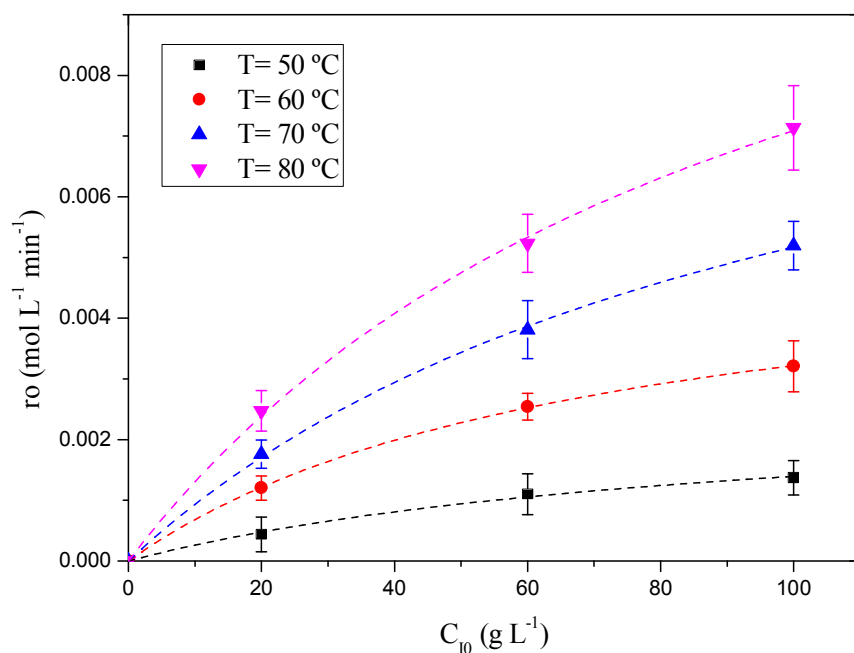
##### *Efecto de la concentración inicial de ibuprofeno y de la temperatura*

El posible efecto inhibidor del reactivo (ibuprofeno) en la esterificación enzimática del ibuprofeno con la glicerina en medio orgánico fue estudiado variando la cantidad inicial de ibuprofeno entre 20 a  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La posible desactivación de la enzima se estudió variando la temperatura entre 50 a  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , manteniendo en todos los casos constantes la concentración de enzima CALB-L ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y la relación Gli/Tol en 20/5. En la Figura 4.9 se puede apreciar que, para cualquier temperatura considerada, la velocidad inicial de la esterificación se incrementa con la concentración inicial de ibuprofeno de

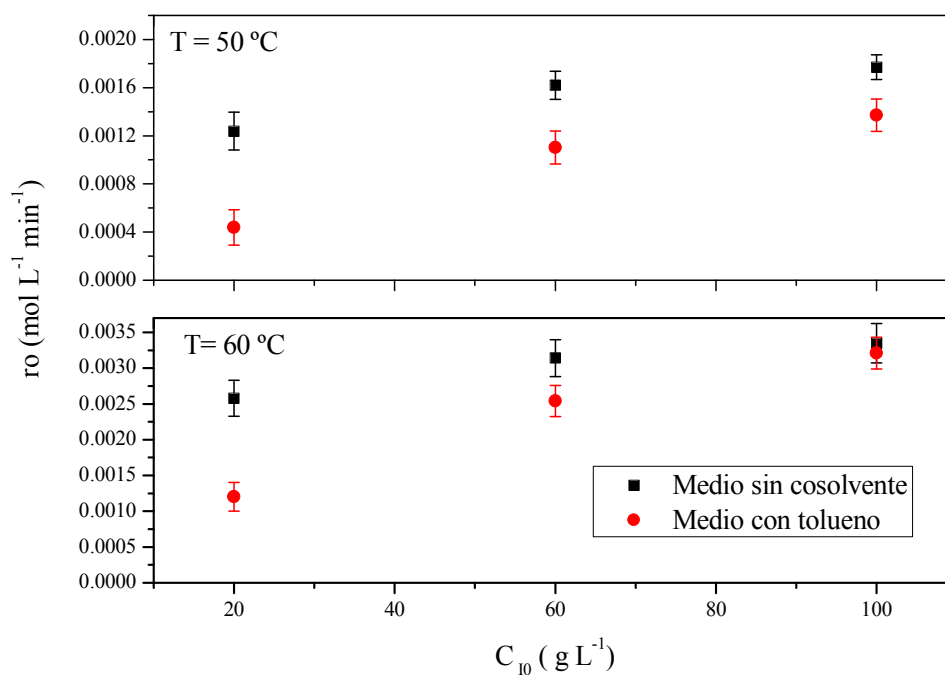


manera hiperbólica, siguiendo la tendencia típica explicada por Michaelis y Menten, como sucede en el caso del sistema sin cosolvente. Además, no se apreció desactivación a tiempos de reacción elevados, incluso a una temperatura de 80 °C y a la mayor concentración de ibuprofeno, como; por el contrario, sucede cuando se emplea enzima libre y ácido benzoico (Tamayo y col., 2012). Sin embargo, en la literatura se ha estudiado la desactivación térmica de la enzima CALB-L en tolueno en el intervalo entre 40 y 100 °C, observándose una máxima actividad de la enzima libre CALB a T=40 °C; por encima de esta temperatura se ha descrito una caída en el porcentaje de actividad relativa tanto más acusado cuanto mayor es la temperatura (Poojari y col., 2013).

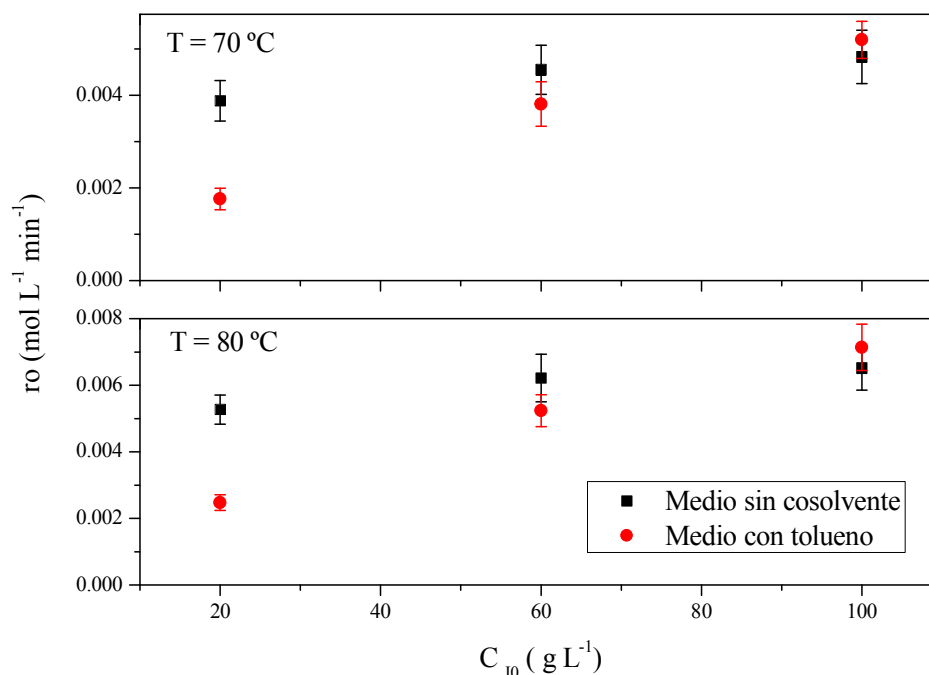
En las Figuras 4.10 y 4.11, se muestra la velocidad inicial de esterificación enzimática en función de la concentración inicial de ibuprofeno, para el medio libre de disolvente, el cual fue descrito en el capítulo anterior, y un medio en presencia de un disolvente orgánico (tolueno). Comparando las velocidades iniciales de estos dos sistemas a una temperatura de 50, 60, 70 y 80 °C, se puede observar, en la Figura 4.10 que las velocidades iniciales de esterificación son menores en el medio con cosolvente que en aquel que está en ausencia de un medio orgánico. Esto puede ser debido a que la enzima en presencia de un disolvente orgánico puede presentar cierta rigidez en su estructura en comparación con un medio acuoso, lo que disminuiría su actividad (Idris y col., 2012). Sin embargo, a una concentración inicial de ibuprofeno de 100 g·L<sup>-1</sup> y a una temperatura de 70 y 80 °C, estas diferencias no existen, de hecho la velocidad inicial en el medio de reacción con cosolvente es ligeramente mayor que en el medio de reacción sin cosolvente. Esto puede ser debido a que la solubilidad del ibuprofeno en la glicerina crece exponencialmente con la temperatura, y, en su reparto entre el tolueno y glicerina, el ibuprofeno se desplaza hacia la glicerina según la temperatura aumenta. Este mismo reparto, a bajas temperaturas, justificaría una concentración baja de ibuprofeno en la glicerina, incluso menor que lo que marca su solubilidad, explicando lo que sucede a 50 °C cuando se comparan los sistemas de reacción con la lipasa en disolución en presencia y en ausencia de tolueno como cosolvente.



**Figura 4.9.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina e ibuprofeno frente a la concentración inicial de ibuprofeno.



**Figura 4.10.** Velocidad inicial *versus* concentración inicial de ibuprofeno en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB-L a 50 °C y 60 °C

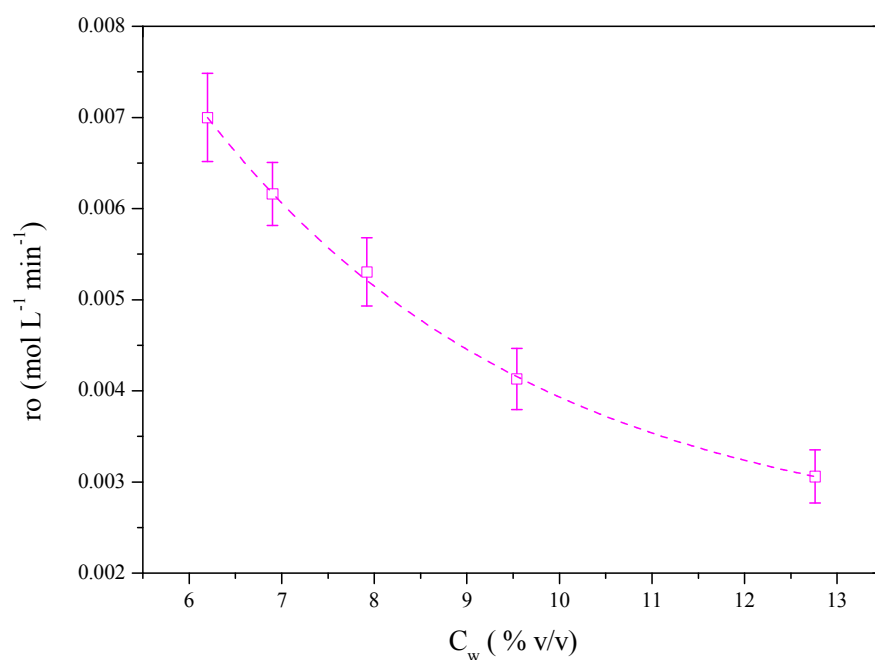


**Figura 4.11.** Velocidad inicial versus concentración inicial de ibuprofeno en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB-L a 70 °C y 80 °C

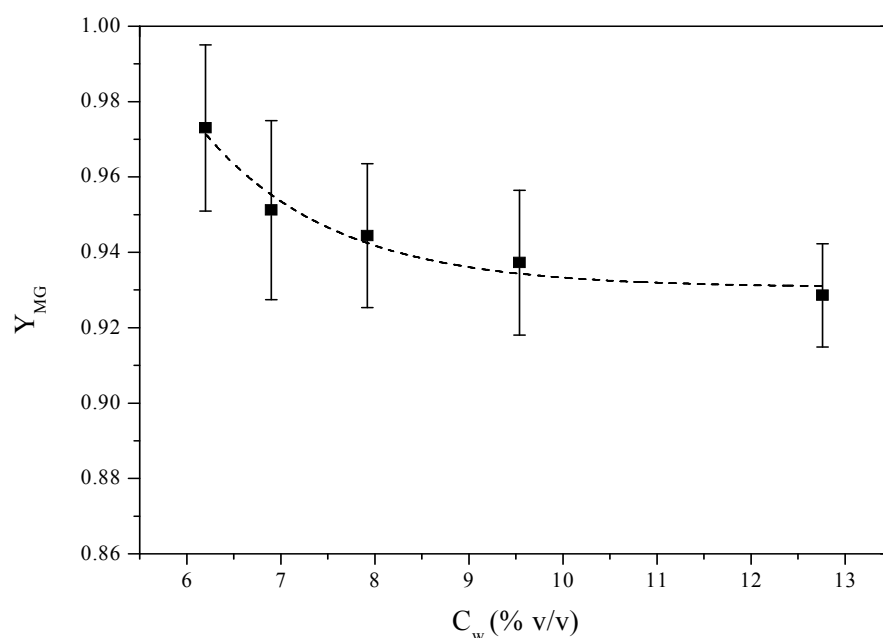
### *Efecto de la concentración de agua*

Como ya se ha comentado, el agua es importante para mantener la flexibilidad e hidratación de la enzima y, por tanto, mantener su actividad y estabilidad. La inhibición por agua, un producto de la esterificación de glicerina e ibuprofeno, se ha estudiado en el intervalo de 6 a 13 %v/v, empleando una velocidad de agitación de 720 rpm una temperatura fija de 80 °C y una concentración inicial de ibuprofeno de 100 g·L<sup>-1</sup>, con una concentración de enzima 2 g·L<sup>-1</sup>. Las muestras de los experimentos siempre tienen una cierta cantidad de agua debido a que el preparado enzimático está formado por glicerina, sorbitol y agua, como se ha indicado en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos, siendo importante el volumen añadido de agua en cada experimento. En la Figura 4.12, se puede observar que la velocidad inicial de esterificación disminuye a medida que aumenta la concentración de agua en el medio de reacción. En disolventes hidrofóbicos, como es el caso, es fácil deducir que el agua se va acumular cerca del centro activo de la enzima, en torno a los aminoácidos polares; esta acumulación de agua cerca de la zona de reacción, por adición de cierta cantidad de agua, puede incrementar el tamaño del área de la interfase de reacción y así se podría favorecer la reacción inversa de hidrólisis (Gog y

col., 2012; Tan y col., 2010), con lo que se reduciría el rendimiento final del monoéster, como puede ser observado en la Figura 4.13.



**Figura 4.12.** Velocidad inicial *versus* la concentración de agua en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB-L.  
Condiciones: C<sub>I0</sub>=100 g·L<sup>-1</sup>; T=80 °C; C<sub>E</sub>=2 g·L<sup>-1</sup> y N=720 rpm



**Figura 4.13.** Rendimiento final de monoéster de ibuprofeno *versus* la concentración de agua en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB-L.  
Condiciones: C<sub>I0</sub>=100 g·L<sup>-1</sup>; T=80 °C; C<sub>E</sub>=2 g·L<sup>-1</sup> y N=720 rpm

## **4.2.- DETERMINACIÓN del MODELO CINÉTICO**

En este apartado, se indican los resultados obtenidos en experimentos realizados con varias concentraciones de ibuprofeno y diferentes temperaturas para el sistema con enzima libre en presencia de tolueno y se formulan distintos modelos cinéticos, seleccionando el que mejor se ajuste a los datos experimentales; así, se alcanza el objetivo 2 planteado al comienzo de este capítulo.

### **4.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos**

Al observarse que el tolueno se evapora durante los experimentos de esterificación, pudiendo arrastrar agua que se vaya formando y, por tanto, pudiéndose desplazar el equilibrio de la reacción de esterificación, se han llevado a cabo experimentos tanto en un reactor abierto (A) como en uno cerrado (B). En ambos casos, las condiciones de operación han sido: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, relación en volumen de glicerina y tolueno (Gli/Tol) de 20/5, concentración de enzima de 2 g·L<sup>-1</sup>, concentración de agua de 6,4 % v/v y velocidad de agitación de 720 rpm. La Tabla 4.2 indica los experimentos realizados en ambos sistemas, mientras que, en las Tablas 4.3 a 4.6 se muestran los datos experimentales para el sistema abierto, y en las Tablas 4.7 a 4.10, los datos experimentales para el sistema cerrado.

**Tabla 4.2.** Experimentos realizados para el sistema con enzima libre (CALB L) en ausencia de disolvente orgánico, en reactor abierto y en reactor cerrado

<b>Experimento</b>	<b>Sistema</b>	<b>T (°C)</b>	<b>C<sub>10</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>
S2E1	A	50	20
S2E2	A	50	60
S2E3	A	50	100
S2E4	A	60	20
S2E5	A	60	60
S2E6	A	60	100
S2E7	A	70	20
S2E8	A	70	60
S2E9	A	70	100
S2E10	A	80	20
S2E11	A	80	60
S2E12	A	80	100
S2E13	B	50	20
S2E14	B	50	60
S2E15	B	50	100
S2E16	B	60	20
S2E17	B	60	60
S2E18	B	60	100
S2E19	B	70	20
S2E20	B	70	60
S2E21	B	70	100
S2E22	B	80	20
S2E23	B	80	60
S2E24	B	80	100

**Tabla 4.3.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema A, T=50 °C

Tiempo (min)	S2E1 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S2E2 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S2E3 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.060	0.006	0.050	0.015	0.040	0.019
20	0.100	0.010	0.080	0.023	0.060	0.029
30	0.130	0.013	0.110	0.032	0.080	0.039
40	0.150	0.015	0.130	0.038	0.110	0.053
60	0.190	0.018	0.170	0.049	0.140	0.068
90	0.240	0.023	0.220	0.064	0.190	0.092
120	0.280	0.027	0.270	0.079	0.240	0.116
150	0.320	0.031	0.290	0.084	0.260	0.126
180	0.360	0.035	0.320	0.093	0.280	0.136
240	0.410	0.040	0.370	0.108	0.340	0.165
300	0.480	0.047	0.460	0.134	0.400	0.194
360	0.530	0.051	0.500	0.145	0.450	0.218
420	0.590	0.057	0.550	0.160	0.500	0.242
480	0.590	0.057	0.570	0.166	0.530	0.257

**Tabla 4.4.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema A, T=60 °C

Tiempo (min)	S2E4 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C		S2E5 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C		S2E6 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.140	0.014	0.070	0.020	0.100	0.048
20	0.160	0.016	0.130	0.038	0.140	0.068
30	0.190	0.018	0.180	0.052	0.160	0.078
40	0.230	0.022	0.220	0.064	0.180	0.087
60	0.290	0.028	0.290	0.084	0.240	0.116
90	0.360	0.035	0.350	0.102	0.320	0.155
120	0.420	0.041	0.410	0.119	0.370	0.179
150	0.480	0.047	0.470	0.137	0.420	0.204
180	0.540	0.052	0.530	0.154	0.470	0.228
240	0.660	0.064	0.650	0.189	0.610	0.296
300	0.780	0.076	0.760	0.221	0.710	0.344
360	0.870	0.084	0.830	0.241	0.780	0.378
420	0.900	0.087	0.890	0.259	0.840	0.407
480	0.910	0.088	0.900	0.262	0.870	0.422

**Tabla 4.5.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema A, T=70 °C

Tiempo (min)	S2E7 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S2E8 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S2E9 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.180	0.017	0.090	0.026	0.140	0.068
20	0.230	0.022	0.160	0.047	0.190	0.092
30	0.280	0.027	0.230	0.067	0.220	0.107
40	0.330	0.032	0.290	0.084	0.300	0.145
60	0.400	0.039	0.390	0.113	0.380	0.184
90	0.510	0.049	0.510	0.148	0.490	0.238
120	0.620	0.060	0.610	0.177	0.590	0.286
150	0.690	0.067	0.700	0.204	0.710	0.344
180	0.790	0.077	0.780	0.227	0.790	0.383
240	0.910	0.088	0.870	0.253	0.820	0.398
300	0.950	0.092	0.940	0.273	0.890	0.431
360	0.990	0.096	0.980	0.285	0.920	0.446
420	0.990	0.096	0.990	0.288	0.940	0.456
480	0.990	0.096	0.990	0.288	0.940	0.456

**Tabla 4.6.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema A, T=80 °C

Tiempo (min)	S2E10 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S2E11 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S2E12 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.130	0.013	0.190	0.055	0.100	0.048
20	0.270	0.026	0.250	0.073	0.190	0.092
30	0.330	0.032	0.300	0.087	0.270	0.131
40	0.420	0.041	0.370	0.108	0.340	0.165
60	0.550	0.053	0.470	0.137	0.470	0.228
90	0.690	0.067	0.620	0.180	0.610	0.296
120	0.790	0.077	0.790	0.230	0.720	0.349
150	0.860	0.083	0.860	0.250	0.820	0.398
180	0.940	0.091	0.910	0.265	0.920	0.446
240	0.960	0.093	0.940	0.273	0.960	0.465
300	0.960	0.093	0.950	0.276	0.970	0.470
360	0.970	0.094	0.960	0.279	0.970	0.470
420	0.970	0.094	0.960	0.279	0.970	0.470
480	0.970	0.094	0.960	0.279	0.970	0.470



**Tabla 4.7.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema B, T=50 °C

Tiempo (min)	S2E13 CI0= 20 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S2E14 CI0= 60 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S2E15 CI0= 100 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.090	0.009	0.080	0.023	0.050	0.024
20	0.150	0.015	0.130	0.038	0.090	0.044
30	0.180	0.017	0.168	0.049	0.120	0.058
40	0.210	0.020	0.185	0.054	0.145	0.071
60	0.254	0.025	0.221	0.064	0.170	0.083
90	0.294	0.028	0.255	0.074	0.205	0.099
120	0.350	0.034	0.290	0.084	0.240	0.116
150	0.390	0.038	0.330	0.096	0.274	0.133
180	0.425	0.041	0.353	0.103	0.300	0.145
240	0.455	0.044	0.408	0.119	0.360	0.175
300	0.506	0.049	0.450	0.131	0.398	0.193
360	0.530	0.051	0.480	0.140	0.430	0.208
420	0.550	0.053	0.510	0.148	0.460	0.223
540	0.570	0.055	0.540	0.157	0.510	0.247
660	0.580	0.056	0.560	0.163	0.540	0.262
900	0.600	0.058	0.580	0.169	0.560	0.271
1080	0.610	0.059	0.590	0.172	0.570	0.276
1380	0.620	0.060	0.600	0.175	0.580	0.281

**Tabla 4.8.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema B, T=60 °C

Tiempo (min)	S2E16 CI0= 20 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C		S2E17 CI0= 60 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C		S2E18 CI0= 100 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.120	0.012	0.119	0.035	0.085	0.041
20	0.210	0.020	0.150	0.044	0.119	0.058
30	0.274	0.027	0.182	0.053	0.133	0.065
40	0.321	0.031	0.225	0.065	0.174	0.084
60	0.368	0.036	0.321	0.093	0.264	0.128
90	0.420	0.041	0.364	0.106	0.311	0.151
120	0.466	0.045	0.417	0.121	0.353	0.171
150	0.501	0.049	0.464	0.135	0.394	0.191
180	0.540	0.052	0.498	0.145	0.440	0.213
240	0.601	0.058	0.553	0.161	0.498	0.241
300	0.630	0.061	0.589	0.171	0.535	0.260
360	0.650	0.063	0.604	0.176	0.583	0.283
420	0.670	0.065	0.624	0.182	0.580	0.281
540	0.684	0.066	0.645	0.188	0.604	0.293
660	0.695	0.067	0.657	0.191	0.627	0.304
900	0.704	0.068	0.675	0.196	0.648	0.314
1080	0.714	0.069	0.684	0.199	0.662	0.321
1380	0.720	0.070	0.697	0.203	0.676	0.328

**Tabla 4.9.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema B, T=70 °C

Tiempo (min)	S2E19 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S2E20 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S2E21 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.150	0.015	0.130	0.038	0.096	0.047
20	0.331	0.032	0.196	0.057	0.142	0.069
30	0.393	0.038	0.253	0.074	0.186	0.090
40	0.423	0.041	0.308	0.089	0.267	0.129
60	0.483	0.047	0.375	0.109	0.304	0.147
90	0.540	0.052	0.480	0.140	0.389	0.189
120	0.581	0.056	0.518	0.151	0.437	0.212
150	0.610	0.059	0.560	0.163	0.498	0.241
180	0.630	0.061	0.609	0.177	0.534	0.259
240	0.654	0.063	0.634	0.184	0.564	0.273
300	0.673	0.065	0.656	0.191	0.612	0.297
360	0.684	0.066	0.664	0.193	0.634	0.307
420	0.697	0.068	0.671	0.195	0.651	0.316
540	0.709	0.069	0.689	0.200	0.669	0.324
660	0.718	0.070	0.695	0.202	0.691	0.335
900	0.724	0.070	0.704	0.205	0.712	0.345
1080	0.728	0.071	0.713	0.207	0.718	0.348
1380	0.734	0.071	0.716	0.208	0.727	0.352

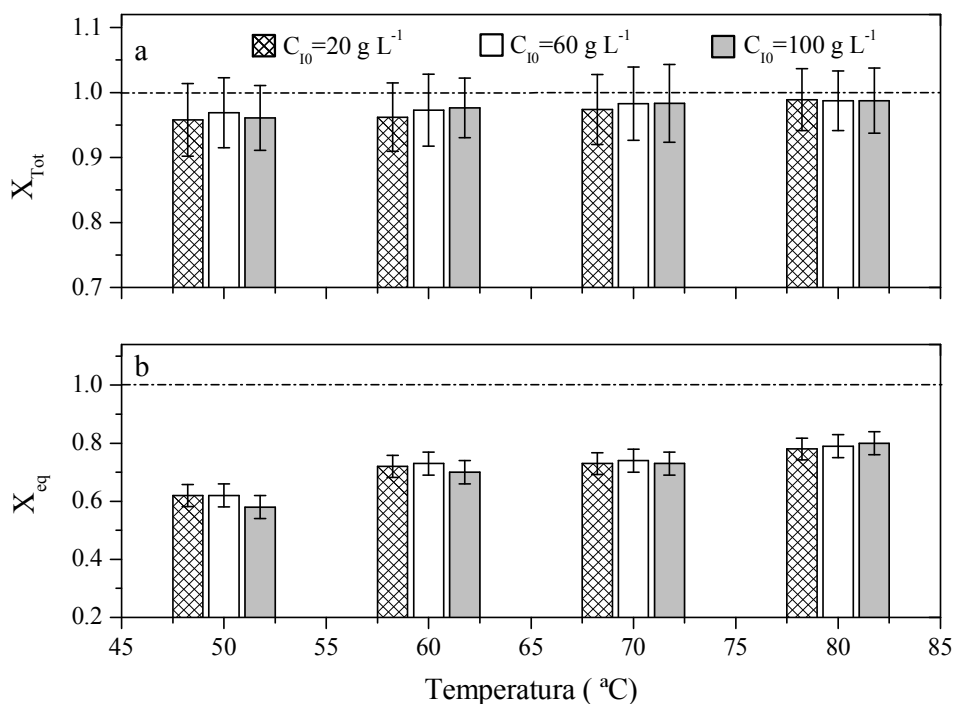
**Tabla 4.10.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno sistema B, T=80 °C

Tiempo (min)	S2E22 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S2E23 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S2E24 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.220	0.021	0.142	0.041	0.101	0.049
20	0.353	0.034	0.214	0.062	0.167	0.081
30	0.424	0.041	0.281	0.082	0.225	0.109
40	0.505	0.049	0.365	0.106	0.303	0.147
60	0.555	0.054	0.428	0.125	0.369	0.179
90	0.634	0.061	0.532	0.155	0.462	0.224
120	0.673	0.065	0.592	0.172	0.521	0.253
150	0.694	0.067	0.649	0.189	0.582	0.282
180	0.709	0.069	0.672	0.196	0.619	0.300
240	0.724	0.070	0.715	0.208	0.672	0.326
300	0.739	0.072	0.741	0.216	0.711	0.345
360	0.741	0.072	0.748	0.218	0.734	0.356
420	0.746	0.072	0.753	0.219	0.748	0.363
540	0.751	0.073	0.756	0.220	0.762	0.369
660	0.753	0.073	0.761	0.221	0.773	0.375
900	0.751	0.073	0.765	0.223	0.779	0.378
1080	0.758	0.073	0.769	0.224	0.782	0.379
1380	0.762	0.074	0.772	0.225	0.784	0.380

#### **4.2.2.- Formulación de modelos cinéticos**

Se han propuesto varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno. Para seleccionar el más adecuado, se han ajustado dichos modelos a los datos experimentales obtenidos, comparándolos y discriminando entre ellos según criterios físicos y estadísticos de una forma similar a lo hecho en el capítulo 3 de esta Memoria. Se han considerado dos sistemas, un sistema A donde el tolueno arrastra el agua que se produce en la reacción de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno, y un sistema B donde el agua permanece en el medio de reacción.

Antes de la propuesta de modelos, se debe determinar si la conversión final de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno en los dos sistemas considerado (A y B), para todos los experimentos es total o no; es decir, si la reacción es irreversible o no. La Figura 4.14 muestra las conversiones alcanzadas dentro del intervalo de temperatura 50 a 80 °C y de concentraciones iniciales de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, para el sistema A y B, y con un tiempo de reacción de tres días (72 h). La conversión final ( $X_{Tot}$ ) en el sistema abierto (A) es prácticamente 1, lo que confirma que el agua está siendo desplazada al evaporarse el tolueno (forma un azeótropo con ella). Sin embargo, en el sistema cerrado (B), la conversión de equilibrio ( $X_{Eq}$ ) varía entre 0,6 y 0,8 según la temperatura pasa de 50 a 80 °C, al acumularse el agua en la zona de reacción. Si se compara este resultado con el sistema en reacción en ausencia de cosolvente, hay que tener en cuenta que el agua es el compuesto más volátil de todos los implicados y que, al ser un sistema también abierto, es muy probable que el agua también se evapore en este sistema, aún a menor velocidad o en menor cuantía que en el sistema abierto en presencia de cosolvente. Para el sistema que nos ocupa, con tolueno como cosolvente, se propondrán, por consiguiente, modelos cinéticos para una reacción irreversible para el sistema A y para una reacción reversible en el caso del sistema B.



**Figura 4.14.** Conversión final de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con cosolvente a) sistema A y b) sistema B

Como se ha mencionado en el capítulo 3, la reacción de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno se ha llevado a cabo con un exceso de glicerina con respecto a la concentración inicial de ibuprofeno ( $C_{\text{glicerina}} \gg C_{\text{ibuprofeno}}$ ). Los modelos que se proponen son los siguientes:

**Modelo 1:** Modelo potencial de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno, donde se considera constante la concentración de glicerina por estar en gran exceso con respecto a la concentración de ibuprofeno. Este modelo ha sido empleado en esterificaciones con polialcoholes donde se considera un exceso del ácido o el alcohol (Ladero y col., 2012), y también en la esterificación del ibuprofeno usando la enzima lipasa inmovilizada *Rhizomucor miehei* (Sánchez y col., 2000).

**Modelo 2:** Un modelo tipo Michaelis-Menten irreversible sin inhibición.

**Modelo 3:** Un modelo hiperbólico donde el numerador corresponde a un modelo de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y el denominador incluye el efecto de la concentración del monoéster.

En el sistema B, la esterificación enzimática es una reacción reversible, por ende, los modelos cinéticos propuestos consideran constante la concentración de glicerina y del agua ya que se encuentran en un gran exceso con respecto a la concentración de ibuprofeno y monoéster ( $C_{\text{glicerina}} \gg C_{\text{ibuprofeno}}$  y  $C_{\text{agua}} \gg C_{\text{éster}}$ ), así se han propuestos los siguientes modelos.

**Modelo 4:** Modelo potencial reversible de pseudo-primer orden para el ibuprofeno y monoéster.

**Modelo 5:** Modelo hiperbólico reversible donde el numeradores de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y el denominador incluye la concentración del monoéster.

**Modelo 6:** Igual que el modelo anterior con la diferencia que en el denominador se incluye el efecto de la concentración del ácido (ibuprofeno).

**Modelo 7:** Un modelo tipo Michaelis-Menten definido en la ecuación [3.5]. En la Tabla 4.11 se muestran las ecuaciones de la velocidad para cada uno de los modelos propuestos.

**Tabla 4.11.** Ecuaciones de velocidad para los diferentes modelos cinéticos propuestos

	Modelo	Ecuación cinética
Sistema A	1	$r = k'_1 \cdot C_I$
	2	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I}$
	3	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
Sistema B	4	$r = k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}$
	5	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
	6	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I}$
	7	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$

#### **4.2.3.- Selección del modelo cinético**

Como se explicó en el capítulo 3, se ha aplicado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden y el algoritmo de Marquardt-Levenberg para el ajuste de los modelos a los datos obtenidos. En las Tablas 4.12 y 4.13 se muestran los parámetros cinéticos y estadísticos para cada uno de los modelos cinéticos propuestos. En la selección y discriminación de los modelos propuestos, el primer criterio físico considerado es el rango de valores de las energías de activación de la constante cinética, que se muestra en la Tabla 4.12. Para el sistema A todas las constantes cinéticas tienen una energía de activación de  $58 \text{ kJ mol}^{-1}$ , mientras que para el sistema B las energías de activación están entre  $14$  y  $45 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; para ambos sistemas (A y B) estos valores se encuentran dentro del intervalo de  $2$ - $200 \text{ kJ mol}^{-1}$  de la mayoría de los modelos cinéticos para reacciones químicas. Otro criterio aplicado fue el signo positivo en todas las constantes de adsorción o de equilibrio, que se alcanzó para todos los modelos propuestos, como puede observarse en la Tabla 4.12; todos los valores de las constantes son positivos para todos los modelos, excepto para el modelo 4. Por lo tanto, la discriminación de los modelos ha de ser realizado únicamente sobre la base de criterios estadísticos, ya que los criterios físicos se cumplen prácticamente en todos los modelos. Ahora bien, el primer criterio estadístico considerado es el valor absoluto del error estándar (Tabla 4.12), éste se mantiene bajo para todas las constantes cinéticas y termodinámicas de los modelos propuestos, por lo que, al 95 % de confianza, el cero no es una solución en ningún caso (intervalos de confianza estrechos). Considerando el parámetro p para todos los modelos propuestos, su valor es  $p < 0.0001$ .

En cuanto a otros criterios estadísticos de discriminación (Ver Tabla 4.13), para el sistema A, los valores más bajo de RMSE, el criterio de información de Akaike ( $AIC_C$ ) y el criterio de información bayesiano (BIC) son los del Modelo 3, mientras que el valor de F más alto es del modelo 1, y el porcentaje de variación explicada (%VE) es más alto en el modelo 3. Ahora bien, en el sistema B, los valores más bajo de RMSE,  $AIC_C$  y BIC son los del Modelo 7, mientras que el valor F más alto es del modelo 5, y el porcentaje de variación explicada (%VE) es más alto en el modelo 7.

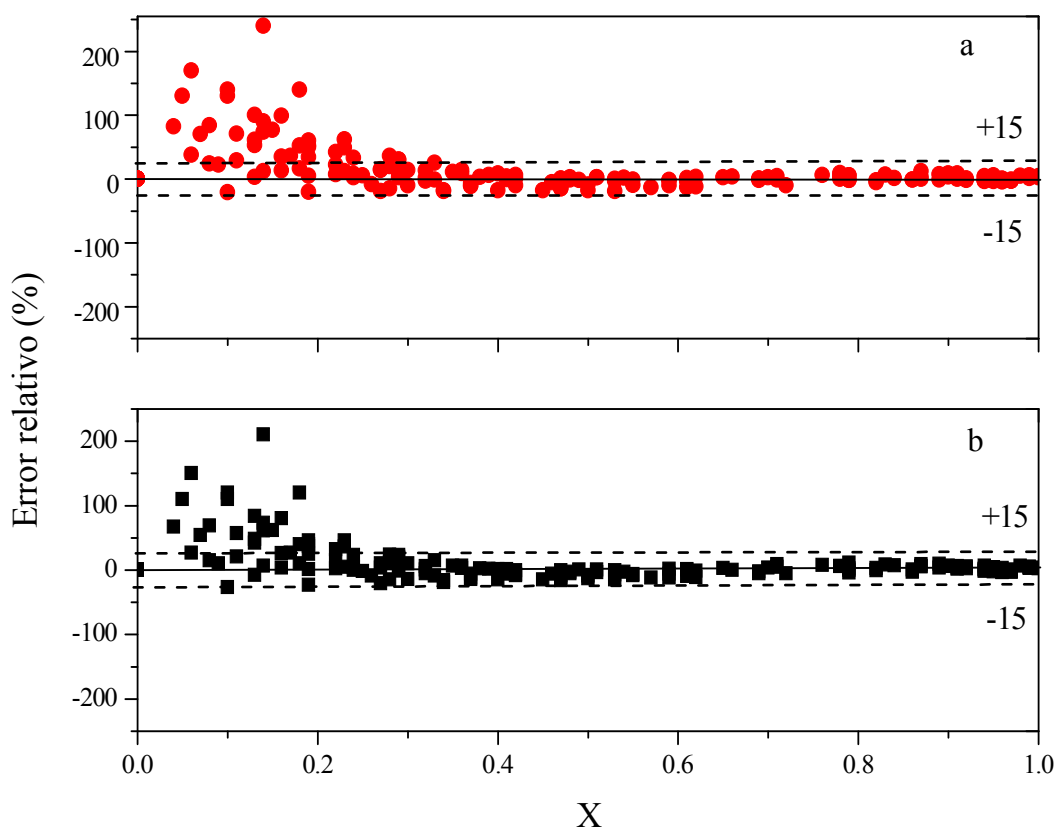
**Tabla 4.12.** Valores físicos con error estándar para cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno

Modelo	Sistema A			Modelo	Sistema B		
	Parámetro	Valor	Error		Parámetro	Valor	Error
1	$\ln k'_{10}$	15.16	0.43	5	$\ln k'_{10}$	11.71	0.45
	$E_{ak'1/R}$	6874	146		$E_{ak'1/R}$	5394	152
2	$\ln k'_{10}$	15.09	0.39		$\ln k'_{20}$	2.72	0.79
	$E_{ak'1/R}$	6812	133		$E_{ak'2/R}$	2637	267
	$K_I$	0.68	0.14		$K_{MG}$	17.70	1.26
3	$\ln k'_{10}$	15.62	0.43	6	$\ln k'_{10}$	4.29	0.53
	$E_{ak'1/R}$	6991	144		$E_{ak'1/R}$	4555	211
	$K_{MG}$	1.22	0.25		$\ln k'_{20}$	9.15	0.62
					$E_{ak'2/R}$	1689	336
					$K_I$	0.00	0.99
4	$\ln k'_{10}$	8.88	0.86	7	$\ln k'_{10}$	11.42	0.44
	$E_{ak'1/R}$	4679	292		$E_{ak'1/R}$	5274	149
	$\ln k'_{20}$	-0.34	1.39		$\ln k'_{20}$	2.30	0.75
	$E_{ak'2/R}$	1794	472		$E_{ak'2/R}$	2468	255
					$K_I$	0.86	0.29
					$K_{MG}$	16.92	1.26

**Tabla 4.13.** Valores estadísticos de cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno

	Modelo	F-Fisher	$N_{dexp}$	K	SQR	AIC	BIC	RMSE	VE(%)
Sistema A	1	15308	180	2	0.349	-1119	-6.19	0.044	98.14
	2	11852	180	3	0.301	-1144	-6.31	0.040	98.39
	3	11852	180	3	0.297	-1147	-6.32	0.041	98.42
Sistema B	4	5517	228	4	0.623	-1337	-5.81	0.052	94.86
	5	22615	227	5	0.122	-1699	-7.41	0.023	98.99
	6	7670	227	5	0.357	-1454	-6.33	0.023	97.05
	7	19633	228	6	0.117	-171	-7.43	0.022	99.04

En la Figura 4.15 se muestra la evolución del error relativo de los modelos propuestos *versus* la conversión de ibuprofeno, para todos los datos de los experimentos realizados del sistema A. El error experimental se estima en el intervalo de 15-20% (representado por las líneas punteadas), como puede observarse en la Figura 4.15 a y b, el modelo 1 y el modelo 3, a una conversión por debajo de 0,25; los valores estimados presentan una sobrestimación con respecto a los datos experimentales, mientras que por encima de 0,2 el error relativo está dentro de los límites del error experimental en ambos modelos. Así, tanto el modelo 1 como el modelo 3 tienen una buena bondad de ajuste en los intervalos estrechos para las constantes cinéticas, al igual que los otros parámetros estadísticos.

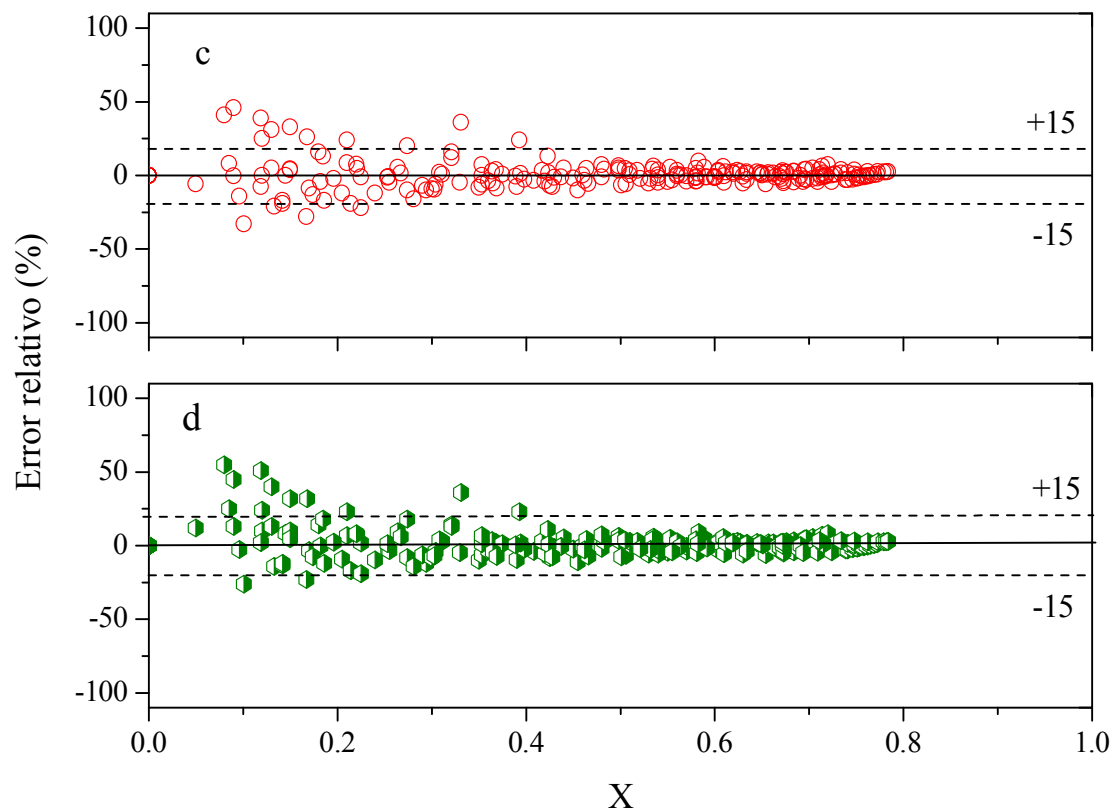


**Figura 4.15.** Error relativo *versus* la conversión del sistema abierto para a) Modelo 1 potencial pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y b) Modelo 3 hiperbólico pseudo orden 1 para el ibuprofeno

En la Figura 4.16, se muestra la evolución de los errores relativos *versus* la conversión para todos los datos obtenidos experimentalmente para el sistema B, al igual que los modelos anteriores, se observa que para algunos valores de conversión menores a 0,2; hay mayor variación entre los datos experimentales y los datos ajustados. Sin embargo, por encima de 0,2 el error relativo dentro de los límites del error experimental



en ambos sistemas. Por lo tanto, ambos modelos presentan una notable bondad del ajuste en los intervalos estrechos para las constantes cinéticas, al igual que los otros parámetros estadísticos.



**Figura 4.16.** Error relativo *versus* la conversión del sistema cerrado para c) Modelo 5 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster y d) Modelo 7 tipo Michaelis-Menten reversible pseudo-orden 1 para ibuprofeno y monoéster

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, el mejor modelo de los propuestos para el sistema A es el modelo 3, el cual sugiere un modelo hiperbólico irreversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno, siendo representado por la ecuación [4.1], donde se incluyen el valor de los parámetros y sus intervalos de confianza. Mientras que, para el sistema B el mejor modelo de los propuestos corresponde al modelo 7, modelo simple tipo Michaelis-Menten de una reacción reversible incluyendo la esterificación e hidrólisis, siendo de pseudo-cero orden para la glicerina y el agua, representado mediante la ecuación [4.2]. En las Figuras 4.17 y 4.18 se muestra el ajuste del Modelo 3 a los datos experimentales para todas las concentraciones iniciales de ibuprofeno y todas las temperaturas estudiadas para el sistema A (sistema abierto). Mientras que, en las Figuras 4.19 y 4.20 se presenta el ajuste del Modelo 7 a los

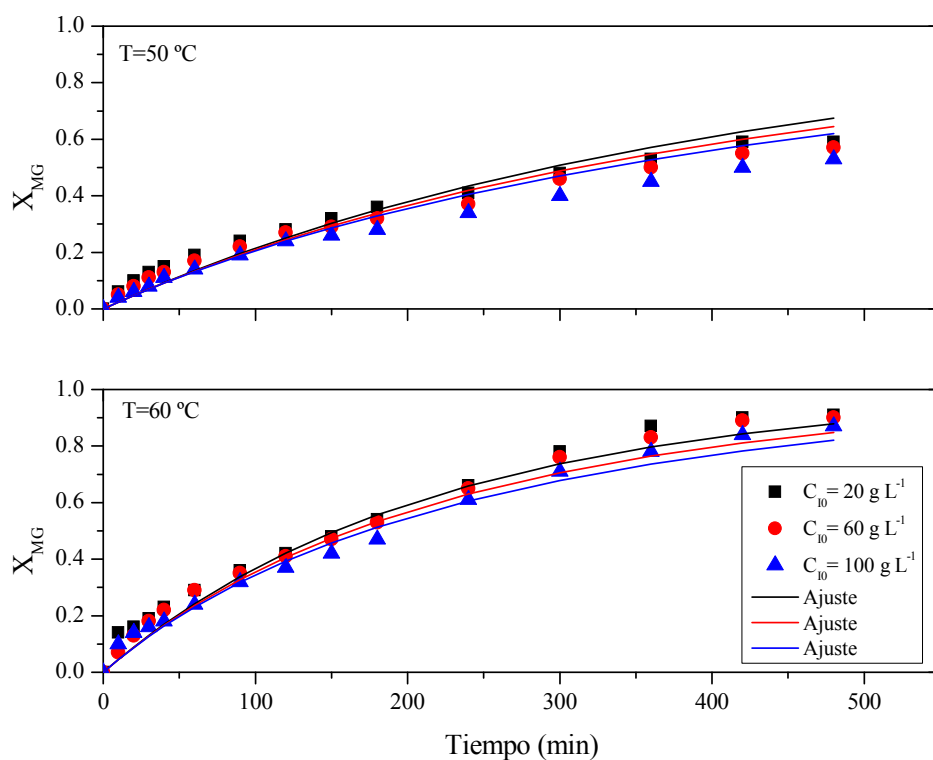
datos experimentales obtenidos para el sistema B (sistema cerrado). Como se puede apreciar, los ajustes para ambos modelos evidencian su adecuación en el intervalo de las condiciones experimentales estudiado; sin embargo, se observan que hay ciertas desviaciones en todas las concentraciones estudiadas a una temperatura de 50 °C, en el caso del sistema A. De igual manera, se observa en el caso del sistema B a una concentración de 20 g·L<sup>-1</sup> y a una temperatura una desviación a los datos experimentales en el intervalo de 100 a 600 min. Sin embargo, a temperatura de 60, 70 y 80 °C, en ambos sistema A y B, hay bajas desviaciones entre los datos experimentales (puntos) y las líneas que muestran los datos calculados por los modelos seleccionados.

**Sistema A (sistema abierto)**

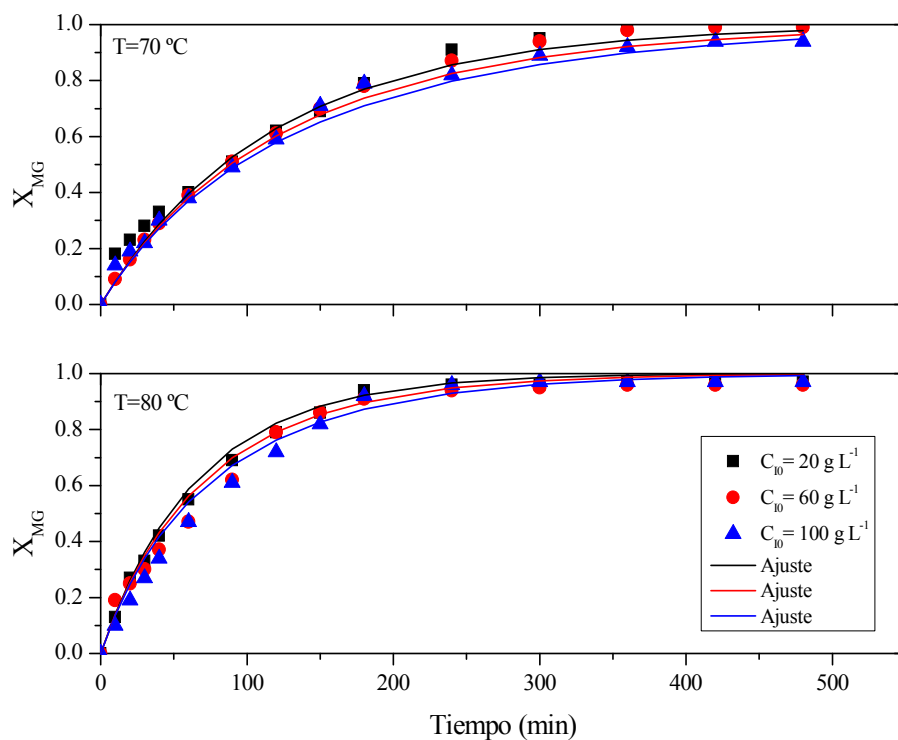
$$r = \frac{\exp\left(15,62 \pm 0,43 - \frac{6991 \pm 143}{T}\right) \cdot C_I}{1 + (1,22 \pm 0,25) \cdot C_{MG}} \quad [4.1]$$

**Sistema B (sistema cerrado)**

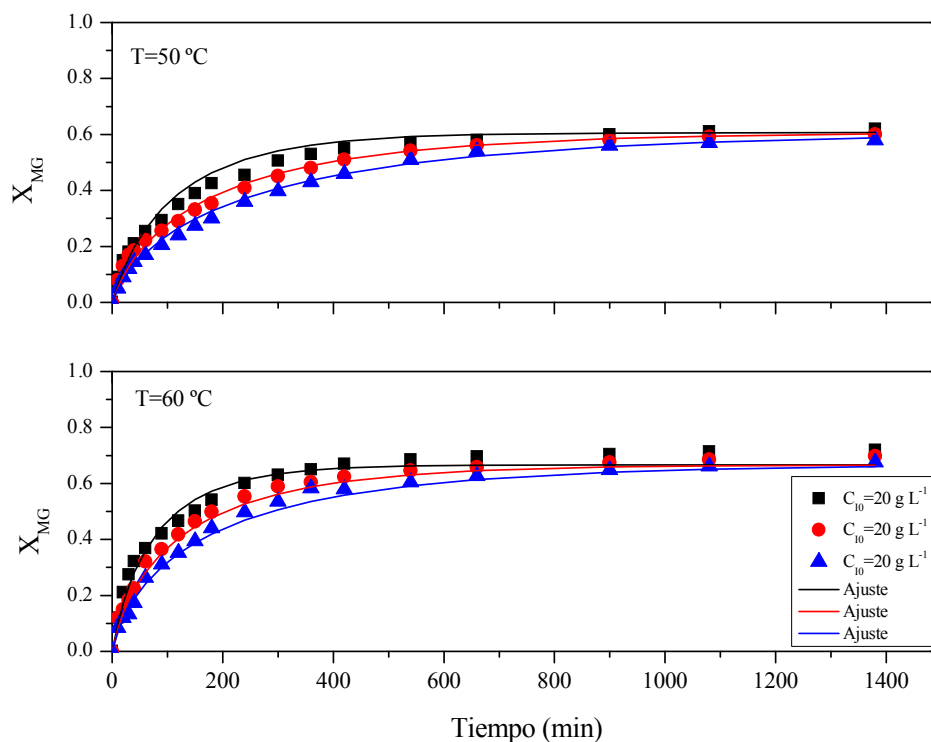
$$r = \frac{\exp\left(11,42 \pm 0,44 - \frac{5274 \pm 148}{T}\right) \cdot C_I - \exp\left(2,30 \pm 0,75 - \frac{2468 \pm 255}{T}\right) \cdot C_{MG}}{1 + (0,86 \pm 0,29) \cdot C_I + (16,92 \pm 1,26) \cdot C_{MG}} \quad [4.2]$$



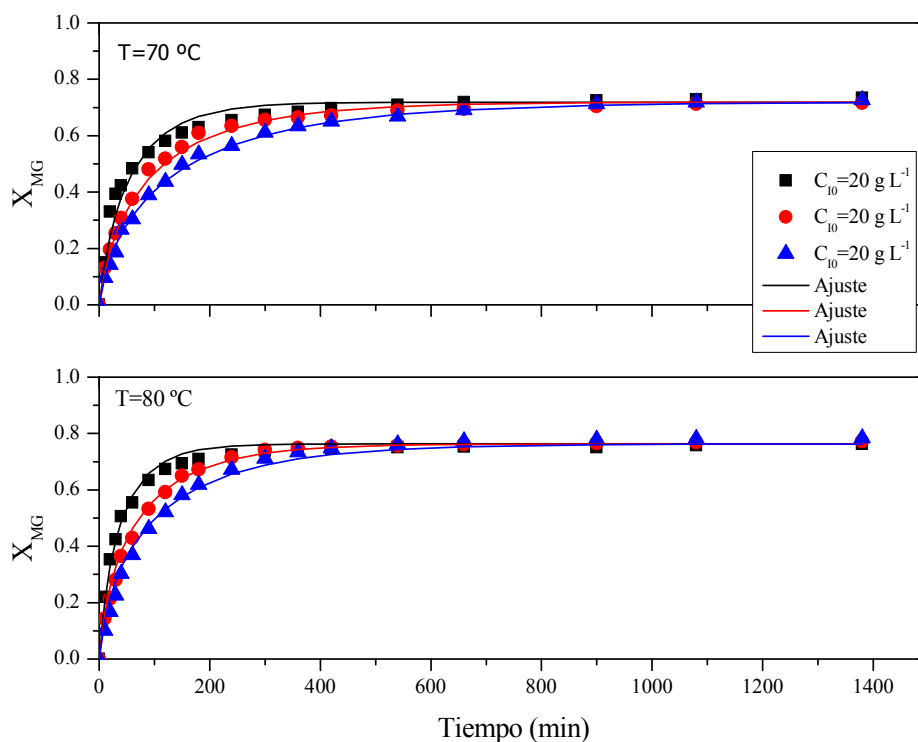
**Figura 4.17.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno en el sistema A (sistema abierto), a una temperatura de 50 y 60 °C



**Figura 4.18.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno en el sistema A (sistema abierto), a una temperatura de 70 y 80 °C



**Figura 4.19.** Ajuste de Modelo 7 tipo Michaelis-Menten reversible con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster en el sistema B (sistema cerrado), a una temperatura de 50 y 60 °C



**Figura 4.20.** Ajuste de Modelo 7 tipo Michaelis-Menten reversible con pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster en el sistema B (sistema abierto), a una temperatura de 70 y 80 °C

#### 4.3.- REFERENCIAS CITADAS

- Arroyo, M. y J. V. Sinisterra (1994). High Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida antarctica*: A Mechanistic Approach. *The Journal of Organic Chemistry* **59** (16): 4410-4417.
- Doukyu, N. y H. Ogino (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal* **48** (3): 270-282.
- Duan, G. y C. B. Ching (1998). Preparative scale enantioseparation of flurbiprofen by lipase-catalysed reaction. *Biochemical Engineering Journal* **2** (3): 237-245.
- Faber, K. (2011). Biotransformations in organic chemistry: a textbook. Springer Science & Business Media.
- Fregolente, P. B. L., L. V. Fregolente, G. M. F. Pinto, B. C. Batistella, M. R. Wolf-Maciel y R. Maciel Filho (2008). Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer. 285-292.
- Gog, A., M. Roman, M. Toşa, C. Paizs y F. D. Irimie (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. *Renewable Energy* **39** (1): 10-16.
- Idris, A. y A. Bukhari (2012). Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances* **30** (3): 550-563.
- Kin, M. G. y S. B. Lee (1996). Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by lipase-catalyzed esterification reaction: effects of water content and solid supports. *Journal of fermentation and bioengineering* **81** (3): 269-271.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-246.
- Koops, B., E. Papadimou, H. Verheij, A. Slotboom y M. Egmond (1999). Activity and stability of chemically modified *Candida antarctica* lipase B adsorbed on solid supports. *Applied microbiology and biotechnology* **52** (6): 791-796.
- Ladero, M., M. de Gracia, F. Trujillo y F. Garcia-Ochoa (2012). Phenomenological kinetic modelling of the esterification of rosin and polyols. *Chemical Engineering Journal* **197**: 387-397.
- Morrone, R., N. D'Antona, D. Lambusta y G. Nicolosi (2010). Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65** (1-4): 49-51.
- Morrone, R., G. Nicolosi, A. Patti y M. Piattelli (1995). Resolution of racemic flurbiprofen by lipase-mediated esterification in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (7): 1773-1778.
- Poojari, Y. y S. J. Clarson (2013). Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2** (1): 7-11.
- Sánchez, A., F. Valero, J. Lafuente y C. Solà (2000). Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase. *Enzyme and Microbial Technology* **27** (1-2): 157-166.
- Secundo, F., G. Carrea, C. Soregaroli, D. Varinelli y R. Morrone (2001). Activity of different *Candida antarctica* lipase B formulations in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering* **73** (2): 157-163.

- Tamayo, J. J., M. Ladero, V. E. Santos y F. Garcia-Ochoa (2012). Esterification of benzoic acid and glycerol to alpha-monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry* **47** (2): 243-250.
- Tan, T., J. Lu, K. Nie, L. Deng y F. Wang (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances* **28** (5): 628-634.
- Trodler, P. y J. Pleiss (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology* **8** (1): 1-10.
- Zhao, X.-G., D.-Z. Wei y Q.-X. Song (2005). A facile enzymatic process for the preparation of ibuprofen ester prodrug in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **36** (1-6): 47-53.

---

*Capítulo 5*  
**ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA  
NOVOZYM 435 sin COSOLVENTE**

---

### **5.1.- ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO CATALIZADA por NOVOZYM 435: PROCESO sin COSOLVENTE**

El uso de enzimas inmovilizadas ha sido ampliamente estudiado en la literatura, sobre todo en reacciones de esterificación, transesterificación e hidrólisis, entre otras. Las principales ventajas de emplear enzimas inmovilizadas son que se pueden separar del medio de reacción con relativa facilidad, se pueden alcanzar altos rendimientos (Trubiano y col., 2007), se puede reutilizar el biocatalizador en varios ciclos en discontinuo o bien emplearlo en procesos continuos (Ansari y col., 2012; Itabaiana Jr y col., 2013). Además, al estar inmovilizada, suele aumentar la estabilidad de la enzima frente a cambios de pH y el aumento de temperatura (Arroyo, 1995). Por el contrario, una de sus desventajas es la posible resistencia al transporte, al ponerse ahora en contacto dos fases (sólida y líquida), ya que los fenómenos difusionales externos e internos pueden limitar la velocidad del proceso global (Ladero y col., 2000; Trubiano y col., 2007).

La técnica de inmovilización consiste en fijar al biocatalizador sobre un soporte sólido hidrofóbico o hidrofílico, ya sea por una unión fuerte, tipo enlace covalente, o por interacciones físicas tipo van der Waals, más débiles; existen muchas técnicas diferentes de inmovilización (Arroyo, 1995; Sun y col., 2010), principalmente las siguientes:

- a) Enlace covalente.
- b) Entrecruzamiento (Cross-linking).
- c) Atrapamiento en matrices de gel.
- d) Adsorción.
- e) Inclusión en membranas.

Comúnmente, dependiendo del tipo de técnica de inmovilización usada, la actividad puede verse reducida por pérdida de centros activos accesibles y por la resistencia a la difusión de sustratos y productos, a su vez, en parte impedida por la proteína, a través de los poros (Chen y col., 2007; Itabaiana Jr y col., 2013; Jun y col., 2013; Ladero y col., 2001).

La forma inmovilizada de la enzima CALB es comercializada por la empresa Novozymes bajo el nombre de Novozym 435; la enzima está inmovilizada sobre una resina catiónica de intercambio iónico (Lewatit VPOC 1600). Este preparado enzimático ha sido usado en la esterificación de profenos, tales como naproxeno (Morrone y col.,



2010), ibuprofeno (Foresti y col., 2009; José y col., 2010), flurbiprofeno (Duan y col., 1998), ketoprofeno (Duan y col., 1997); también se ha utilizado en la producción de biodiesel (Gog y col., 2012; Hong y col., 2011; José y col., 2013), y en el desarrollo de bioprocesos de polimerización (Chen y col., 2007; Frampton y col., 2013; Kumar y col., 2000). Asimismo, se ha empleado con diversos disolventes y medios renovables, como dióxido de carbono supercrítico, líquidos iónicos (Contesini y col., 2006) y glicerina (Tamayo, 2014; Wolfson y col., 2010).

A pesar de que la inmovilización mejora la estabilidad de la enzima, en la literatura hay algunos ejemplos de reacciones catalizadas por lipasas inmovilizadas donde se ha observado desactivación por efecto de la temperatura (Kobayashi y col., 2008; Yadav y col., 2008) o del ácido (Hari Krishna y col., 2001; Martinsa y col., 2011). En la hidrólisis de benzoato de fenilo, se ha descrito que la enzima Novozym 435 se desactiva por la acción del sustrato (hidracina) y del producto (fenol); el modelo cinético de la desactivación considera dos reacciones en serie de primer orden (Yadav y col., 2010). De igual manera, en la epoxidación de estireno, el preparado Novozym 435 se desactiva como el resultado de tres contribuciones en paralelo; la velocidad de desactivación se describe por cinéticas de primer orden, respecto al peróxido de hidrógeno, al ácido perláurico y al aumento de la temperatura (Yadav y col., 2006).

A continuación, se aborda el estudio de la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435 en un medio libre de cosolvente. En este la glicerina actúa a la vez como reactivo y como disolvente, además, se caracteriza por tener la enzima lipasa inmovilizada, por tanto, es un sistema bifásico (L-S), donde L es la fase formada por el ibuprofeno disuelto en la glicerina, mientras S es la fase constituida por la enzima inmovilizada CALB (Novozym 435). No obstante, puede existir otra fase sólida formada por el ibuprofeno no disuelto en la glicerina, que va a depender de la temperatura de operación. De una forma similar a los apartados anteriores se han planteado los siguientes objetivos:

- a) Determinar las condiciones de operación adecuadas para llevar a cabo la reacción de esterificación de glicerina e ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 en un medio de reacción libre de disolvente.
- b) Proponer un modelo cinético que permita describir los resultados experimentales obtenidos. Para ello, después de formular diversos modelos, se procederá a

seleccionar el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales utilizando criterios físicos y estadísticos.

## **5.1.- ESTUDIO del SISTEMA ANHIDRO**

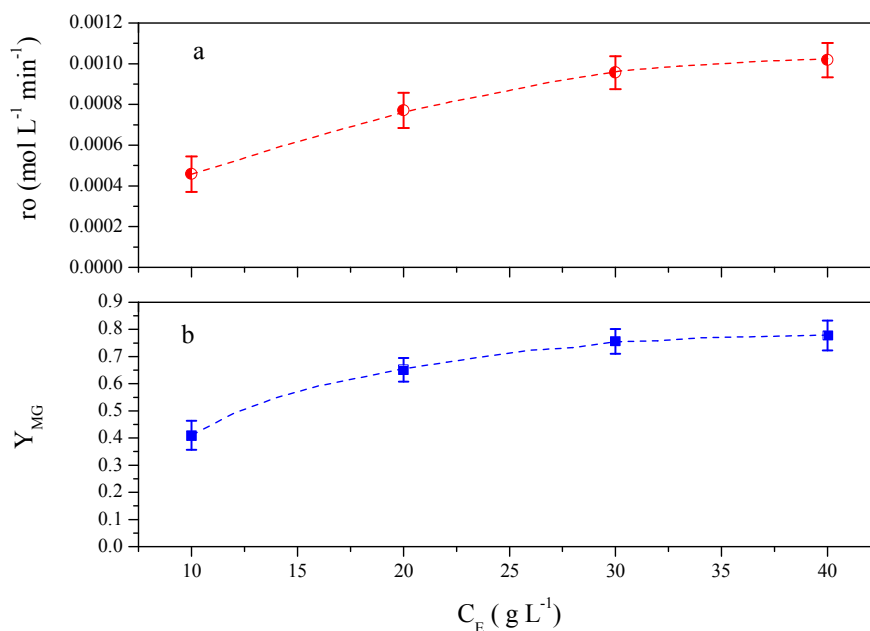
### **5.1.1.- Experimentos previos**

Para dar cumplimiento al primer objetivo se realizaron una serie de experimentos previos, analizando el efecto de las siguientes variables en la velocidad del proceso global de esterificación:

- Efecto de la concentración de enzima.
- Efecto de la velocidad de agitación.
- Efecto del tamaño de partícula del biocatalizador.
- Efecto de la temperatura y de la concentración inicial de ibuprofeno.
- Efecto de la concentración de agua.

#### **5.1.1.1.- Efecto de la concentración de enzima**

En la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno se estudió el efecto de la concentración de enzima variando su valor entre 10 y 40 g·L<sup>-1</sup>. En la Figura 5.1a se muestra la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima empleada. Se puede observar que la velocidad inicial de esterificación aumenta con la concentración de enzima. De igual manera, como se presenta en la Figura 5.1b, al aumentar la concentración de enzima, el rendimiento a monoéster aumenta pero se mantiene casi constante para una concentración de enzima por encima de 30 g·L<sup>-1</sup> (ver Figura 5.1b). Este hecho puede ser explicado debido a que, a altas concentraciones de enzima, hay más sitios activos para el anclaje del sustrato con la enzima (complejo acil-enzima) y, por ende, aumenta la velocidad de la reacción; sin embargo, para altas concentraciones de enzima, se podrían provocar aglomeraciones en las moléculas de enzima y así conducir a mayores limitaciones en la difusión interna, dentro de los poros del biocatalizador heterogéneo (Carvalho y col., 2006). Por tanto, de acuerdo a estos resultados, se elige una concentración de enzima de 30 g·L<sup>-1</sup> para la realización de los siguientes experimentos.



**Figura 5.1.** a) Velocidad inicial y b) Rendimiento final de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima Novozym 435  
Condiciones:  $C_{I0}=60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T=70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $N=720 \text{ rpm}$  y  $C_w=0 \text{ \%v/v}$

### 5.1.1.2.- Estudio de la transferencia de materia

Para comprobar la existencia de posible limitaciones al transporte de materia en la esterificación de glicerina con ibuprofeno en medio libre de disolvente catalizada por derivado inmovilizado comercial Novozym 435, se ha estudiado el efecto de la velocidad de agitación y del tamaño de partícula del biocatalizador y, de esta manera, poder determinar los citados posibles problemas difusionales en la película externa y en el interior de la matriz porosa del biocatalizador.

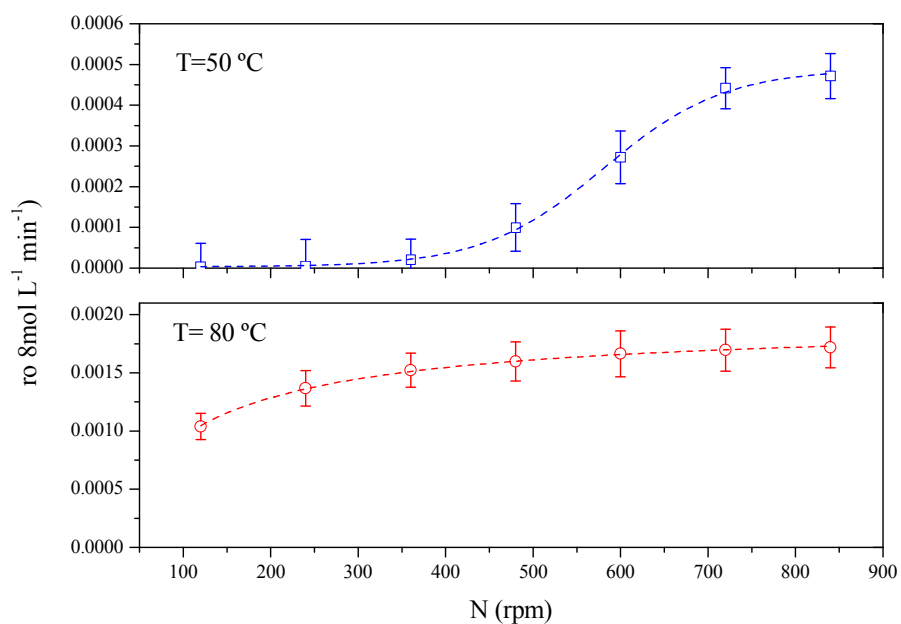
#### *Transferencia de Materia Externa*

La influencia de la velocidad de agitación se estudió a dos temperaturas:  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , variando la agitación entre 120 y 840 rpm. Como puede observarse en la Figura 5.2, la velocidad inicial de esterificación aumenta con el aumento de la velocidad agitación. A una temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , a baja velocidad de agitación, el contacto entre las fases es deficiente (seguramente por la elevada viscosidad del medio de reacción), y este contacto se mejora al aumentar la velocidad de agitación. Como puede observarse en la misma figura, este comportamiento es muy parecido a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ; sin embargo, se observa que los valores de la velocidad inicial de esterificación son menores a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , lo cual puede ser

debido a que la viscosidad de la glicerina es alta a esta temperatura y, además, el ibuprofeno a esta temperatura se puede encontrar, en parte, en estado sólido y, por tanto, la velocidad de transferencia de materia es relativamente baja. Pero al incrementar la temperatura a 80 °C, la viscosidad de la glicerina disminuye notablemente y el ibuprofeno ha cambiado de estado, ya que el ibuprofeno funde a una temperatura alrededor de 70-75 °C; en consecuencia, la velocidad de transferencia de materia debe aumentar. Se puede apreciar que a 80 °C para un valor de velocidad de agitación de 600-840 rpm, no hay cambios significativos en la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno. De forma similar, a 50 °C puede considerarse que no existen cambios en la velocidad inicial por encima de 720 rpm. Se obtuvieron resultados similares en otros procesos, así, en la síntesis de hidrácido de ácido benzoico usando Novozym 435 se estudió el efecto de la velocidad de agitación entre 200 y 800 rpm, concluyendo que por encima de 600 rpm las limitaciones por transferencia externa son despreciables (Yadav y col., 2010), aunque estos datos se refieren a otra reacción, con distinta velocidad pero del mismo orden de magnitud.

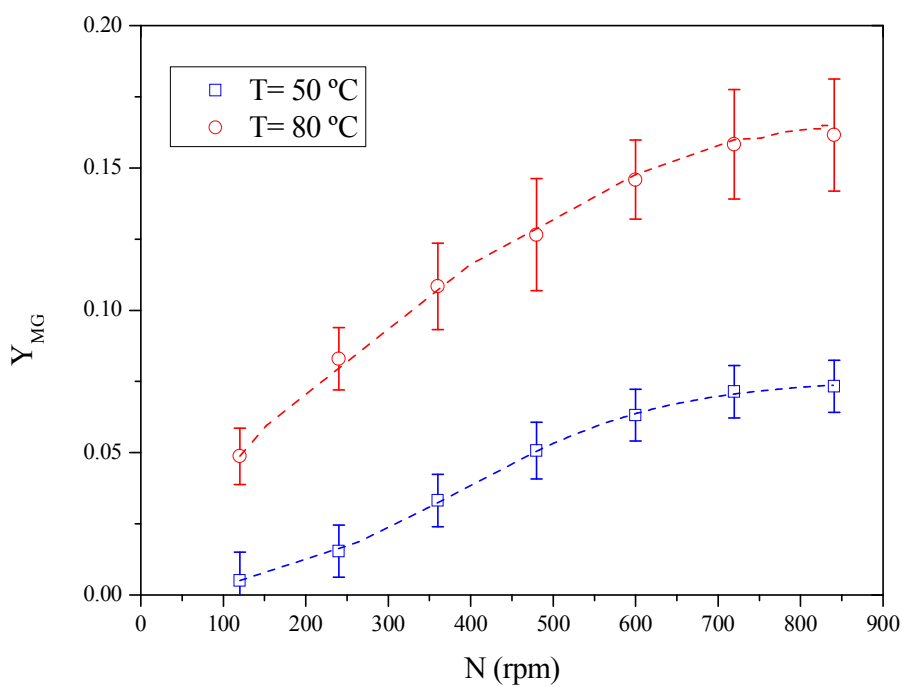
En la Figura 5.3 se muestra el rendimiento final alcanzado en la esterificación de la glicerina con ibuprofeno a ambas temperaturas, 50 y 80 °C: En esta figura se puede observar que un incremento en la velocidad de agitación hasta 600 rpm produce un incremento en el rendimiento final del monoéster de ibuprofeno (MG); sin embargo, con un incremento adicional de la velocidad de agitación desde 720 hasta 800 rpm, el rendimiento en monoéster no presenta cambios significativos, al menos por encima del error experimental estimado.

En consecuencia con todo lo anterior, se ha asumido que, en el intervalo de temperatura estudiado posteriormente, las posibles limitaciones del transporte de materia externas no son significativas si se emplean agitaciones a partir de 720 rpm, siendo el rendimiento en monoéster de ibuprofeno (MG) formado independiente de la velocidad de agitación en las condiciones descritas.



**Figura 5.2.** Efecto de la velocidad de agitación en la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno.

Condiciones:  $C_{I0}=100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=50$  y  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_w=0\text{ \% v/v}$



**Figura 5.3.** Efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento a monoéster en la esterificación de glicerina con ibuprofeno.

Condiciones:  $C_{I0}=100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=50$  y  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_w=0\text{ \% v/v}$

Para corroborar estos resultados, se ha aplicado el módulo de Mears (Mears, 1971) definido por la ecuación [5.1]:

$$Me = \frac{-r_{obs} \cdot d_p \cdot n}{2 \cdot k_L \cdot C_{i,0}} \quad [5.1]$$

donde:  $r_{i,obs}$  es la velocidad de desaparición de reactivo  $i$  ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $d_p$  es el diámetro de partícula del catalizador, que para Novozym 435 es 0,065 cm (Tamayo, 2014),  $n$  es el orden de reacción,  $k_L$  es el coeficiente de transferencia de materia ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y  $C_{i,0}$  es la concentración inicial de reactivo ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Para estimar el coeficiente de transferencia de materia,  $k_L$ , se ha empleado la correlación de Frössling (Doran, 1995), definida por las ecuaciones [5.2], válida para un  $Re < 10^4$ , con las definiciones de los diferentes números adimensionales dadas por las ecuaciones [5.3] a [5.5]:

$$Sh = 2 + 0,6 \cdot Re^{1/2} \cdot Sc^{1/3} \quad [5.2]$$

$$Re = \frac{U \cdot \rho \cdot d_p}{\mu} \quad [5.3]$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D_{ij}} \quad [5.4]$$

$$Sh = \frac{k_L \cdot d_p}{D_{ij}} \quad [5.5]$$

donde:  $Re$  es el número de Reynolds (ecuación [5.3]),  $Sc$  es el número de Schmidt (ecuación [5.4]), y  $Sh$  es el número de Sherwood (ecuación [5.5]),  $U$  es la velocidad ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $d_p$  diámetro de partícula (m),  $\rho$  es la densidad del disolvente ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ),  $\mu$  viscosidad del disolvente (P) y  $D_{ij}$  es la difusividad molecular del reactivo en el disolvente ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

La difusividad molecular  $D_{ij}$  ha sido calculada por la ecuación [5.6] (Wilke y col., 1955):

$$D_{ij} = \frac{7.4 \cdot 10^{-8} \cdot (\phi \cdot M_j)^{0.5} \cdot T}{\mu_m \cdot V_i^{0.6}} \quad [5.6]$$

$$V_i = 0.285 \cdot V_{ci}^{1.048} \quad [5.7]$$

donde:  $\phi$  es un factor adimensional de asociación del disolvente, es un parámetro empírico y su valor se ha determinado igual a 2,6 para agua; 1,9 para metanol; 1,5 para etanol y 1 para disolventes sin asociación molecular; se ha considerado un valor de  $\phi =$

1,9, por tener la glicerina fuertes interacciones moleculares muy parecidas a la del metanol;  $T$  es la temperatura absoluta (K);  $M_j$  es el peso molecular del disolvente ( $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $\mu_m$  es la viscosidad del disolvente (cP),  $V_i$  es el volumen molar a la temperatura de ebullición normal del soluto ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ), que ha sido determinado usando el método de Tyn y Calus (Perry y col., 2008), de acuerdo a la ecuación [5.7], siendo  $V_{ci}$  el volumen molar crítico del soluto ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ), que para el ibuprofeno es 200.

En la Tabla 5.1 se muestran los valores de la viscosidad y la difusividad molecular estimados para la glicerina anhidra. Como se puede apreciar, los valores de difusividad molecular aumentan con la temperatura, debido a que la viscosidad de la glicerina anhidra disminuye con la temperatura

**Tabla 5.1.** Valores de la difusividad molecular y de la viscosidad de la glicerina anhidra estimadas en el intervalo de temperatura de operación estudiado

$T(^{\circ}\text{C})$	$D_{ij} \times 10^{11} (\text{m}^2 \text{s}^{-1})$	$\mu_m (\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1})$
50	1.69	0.142
60	3.04	0.081
70	5.03	0.051
80	8.22	0.031

El criterio de Mears establece que si  $Me < 0,15$  se pueden despreciar las limitaciones de la transferencia de materia externa. Como se puede observar en la Tabla 5.2, para una concentración inicial de ibuprofeno de  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , los valores de velocidad de transferencia de materia ( $k_L a C_{I0}$ ) son mucho mayores que la velocidad inicial de esterificación ( $r_{obs}$ ) y, por ende, el valor de  $Me$  es significativamente menor a 0,15, incluso en las condiciones más bajas de viscosidad y temperatura, de esta manera, las limitaciones por transferencia externa se pueden considerar despreciables. Por tanto, y como se ha descrito previamente, para establecer un buen contacto entre las fases presente en el medio de reacción, se elige un valor de la velocidad de agitación de 720 rpm para la realización de la experimentación posterior.

**Tabla 5.2.** Valores para aplicar el Criterio de Mears a distintas temperaturas y velocidades de agitación

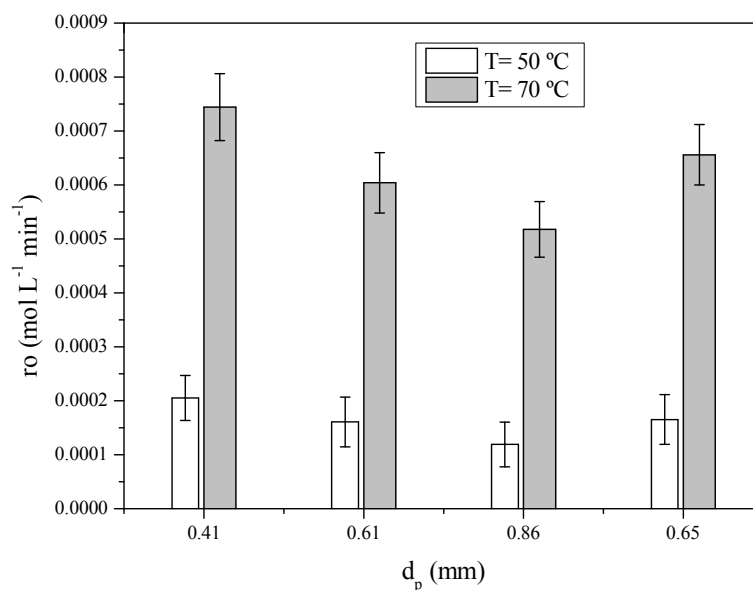
T (°C)	N (rpm)	$r_{obs} \times 10^4$ (mol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_L a' C_{I0}$ (mol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Me x 10 <sup>5</sup>
50	600	1.12	0.88	6.35
	720	1.81	0.97	9.37
	840	1.94	1.04	9.30
80	600	16.6	3.28	25.3
	720	17.0	3.59	23.7
	840	17.2	3.88	22.3

### ***Transferencia de Materia Interna***

Para estudiar la influencia de la transferencia de materia en poros en la velocidad global del proceso, se ha experimentado con diferentes tamaños de partícula del biocatalizador. Para ello, para obtener distintos tamaños de partícula del biocatalizador, el derivado inmovilizado comercial fue tamizado para obtener fracciones de tamaño de partícula entre 0,32-0,5; 0,5-0,7 y 0,7-1 mm.

Se realizaron experimentos con cada una de estas fracciones, fijando las siguientes condiciones de operación:  $C_{I0}=60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T= 50 \text{ y } 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $N=720 \text{ rpm}$  y  $C_w=0 \text{ \% v/v}$ . En la Figura 5.4 se muestran los resultados experimentales de la velocidad inicial de la reacción de esterificación para distintos diámetro medio de partícula ( $d_p$ ) a cada una de las temperaturas consideradas, 50 y 70 °C, en este caso. Se puede observar que a medida que aumenta el tamaño de partícula disminuye la velocidad inicial de esterificación; por tanto, es evidente que existen problemas de difusión, significativas resistencias al transporte en el interior de la partícula del biocatalizador. En este contexto, en una reacción similar, el efecto del tamaño de partícula ha sido estudiado en la síntesis de monobenzoato de glicerol usando Novozym 435 en el intervalo de 0,075 y 0,65 mm, concluyendo, de forma similar, que la difusión interna tiene un efecto significativo en la velocidad de reacción de esterificación del ácido benzoico con glicerina (Tamayo, 2014).





**Figura 5.4.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno *versus* distintos tamaños de partículas de Novozym 435, a temperaturas de 50 y 70 °C.

De esta manera, para comprobar la posible existencia de limitaciones por difusión interna, fue determinado el factor de efectividad ( $\eta$ ) planteando un sistema de ecuaciones para cada una de las fracciones considerada mediante la ecuación [5.8] y corroborando con la fracción media mediante la ecuación [5.11].

$$\frac{\eta_i}{\eta_j} = \frac{r_{obs,i}}{r_{obs,j}} \quad i = 1, 2; j = 2, 3, 1 \quad [5.8]$$

$$\bar{\eta} = \sum_{i=1}^n x_i \cdot \eta_i \quad [5.9]$$

donde:  $i, j$  son los valores correspondiente a cada una de las fracciones de tamaño de partícula,  $\bar{\eta}$  es el factor de efectividad de la fracción media,  $x_i$  es porcentaje en masa de cada una de las fracciones de tamaño de partícula.

En la Tabla 5.3 se muestran los valores calculados del factor de efectividad de acuerdo a este proceder. Como se puede observar, los valores del factor de efectividad calculados son menores que la unidad ( $\eta < 1$ ) presentando valores entre 0,08 y 0,16. Un incremento de la temperatura provoca una ligera disminución en el factor de efectividad, cuando la variación usual es que dicho factor de efectividad disminuya notablemente al aumentar la temperatura. Esto es debido a que, en este sistema, al aumentar la temperatura no solo aumenta notablemente la velocidad de reacción, como es habitual,

sino que también lo hace la velocidad de transferencia de materia, ya que al disminuir notablemente la viscosidad con el aumento de temperatura (ver Tabla 5.1), aumenta la difusividad y, en consecuencia, el coeficiente de difusión efectivo, como puede verse en la última tabla citada. Además, se puede comentar que los valores medios del factor de efectividad se encuentran muy cercanos a los valores para el tamaño de partícula entre 0,5 y 0,7.

**Tabla 5.3.** Valores del coeficiente difusivo, factor de efectividad y módulo de We-Pt a distintas temperaturas a 50 y 70 °C

T (°C)	$D_{ij} \times 10^{11}$ ( $m^2 s^{-1}$ )	$D_e \times 10^{13}$ ( $m^2 s^{-1}$ )	Fracción % w/w	Tamaño partícula (mm)	$r_{obs} \times 10^4$ Novozym 435 ( $mol L^{-1} min^{-1}$ )	$\eta$	We-Pt
50	1.69	1.35	13	0.32-0.5	2.05	0.16	3.7
			52	0.5-0.7	1.61	0.12	6.2
			35	0.7-1	1.19	0.09	9.3
			Media	0.3-1	1.65	0.12	7.4
70	5.03	4.03	13	0.32-0.5	7.44	0.11	4.4
			52	0.5-0.7	6.04	0.09	7.9
			35	0.7-1	5.18	0.08	10.6
			Media	0.3-1	6.56	0.09	9.8

De una forma similar a lo hecho en el caso del estudio de la difusión externa, se trató de comprobar si un criterio muy utilizado, el de Weisz-Prater, predecía, en este caso, la fuerte influencia detectada ahora de la transferencia de materia interna. Para ello, se estimó el módulo de Weisz-Prater (We-Pt) usando la ecuación [5.10]. Este criterio establece que: si  $We-Pt < 0,3$ , las limitaciones por transferencia de materia interna son insignificantes ( $\eta \approx 1$ ); si  $0,3 < We-Pt < 3$ , puede ser que exista una influencia de la transferencia de materia y hay que determinar dicha influencia en la velocidad de reacción; y si  $We-Pt > 3$ , las limitaciones por transferencia de materia deben ser significativa ( $\eta < 1$ ) (Doran, 1995). Mientras que, el valor del coeficiente de difusión efectivo ( $D_e$ ) fue calculado por la ecuación [5.13]:

$$We - Pt = \frac{r_{obs} \cdot d_p^2}{D_e \cdot C_{i,o}} \quad [5.10]$$

$$D_e = \frac{D_{ij} \cdot \varepsilon_p \cdot \sigma}{\tau} \quad [5.11]$$

donde:  $r_{obs}$  es la velocidad de desaparición de reactivo  $i$  ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $d_p$  es el diámetro de partícula del catalizador (m),  $D_e$  coeficiente de difusión efectivo ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $C_{i,0}$  es la concentración inicial de reactivo ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $D_{ij}$  es la difusividad molecular (calculada de acuerdo a la ec. [5.6]);  $\varepsilon_p$  es la porosidad total de la partícula;  $\sigma$  es el factor de constricción y  $\tau$  es la tortuosidad.

En la literatura, los valores de porosidad encontrados para el preparado Novozym 435 son diversos: 0,35 (Haigh y col., 2013); 0,5 (Chesterfield y col., 2012); 0,5 (Dong y col., 2010); en este trabajo se ha considerado un valor de 0,5 para la porosidad. En cuanto a la relación  $\sigma/\tau$ , estos parámetros son empíricos, característicos de la partícula sólida, normalmente considerados como parámetros de ajuste, que tratan de proporcionar información sobre cómo influye la estructura porosa en la velocidad de difusión en el interior del soporte sólido, en este caso del preparado Novozym 435. El factor de constricción,  $\sigma$ , representa la variación del área de sección transversal normal a la difusión, por tanto, es una función de las área máximas y mínimas del poro (Fogler, 1992). Mientras que la tortuosidad ( $\tau$ ) es un parámetro que depende de la geometría del poro. Algunos autores estiman que  $\sigma$  y  $\tau$  para el preparado Novozym 435 es 1 y 6, respectivamente (Chesterfield y col., 2012), lo que no parecen valores muy realistas, ya que hay constricción en los poros. En este estudio, se ha considerado que la tortuosidad toma un valor de 12, y el factor de constricción de 0,2, valores más apropiados teniendo en cuenta la naturaleza del soporte y el gran tamaño de las moléculas de enzima, que seguramente provocan una difusión impedida (Ladero y col., 2007); estos valores proporcionan un valor de la relación de  $\sigma/\tau = 0,016$ .

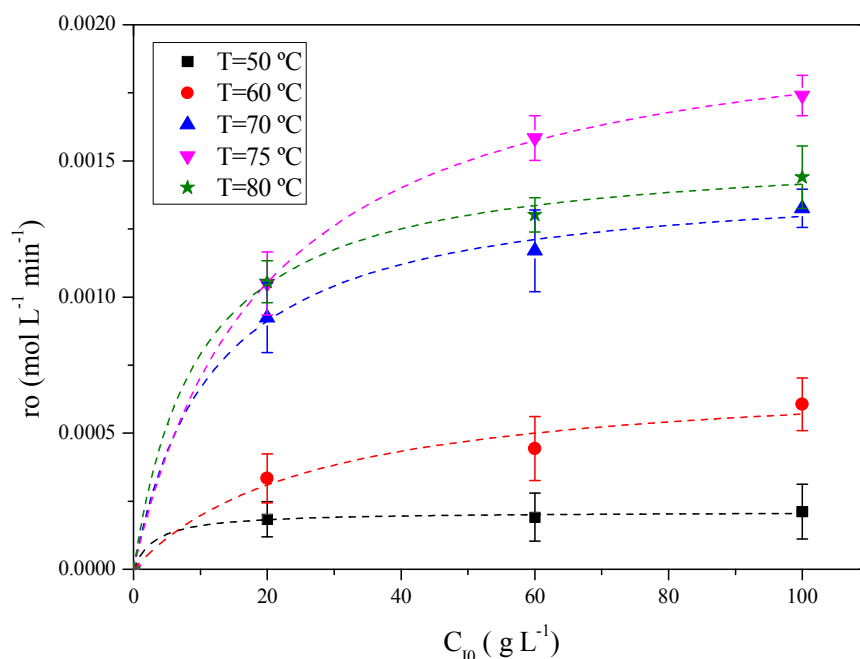
En la Tabla 5.3 se muestran los valores calculados para el módulo de Weisz-Prater y del coeficiente de difusión efectivo. Como se puede apreciar, los valores de Weisz-Prater son mayores que 3 ( $We-Pt > 3$ ), observándose que aumentan notablemente con la temperatura. En cuanto a los valores del coeficiente de difusión efectivo aumentan significativamente con la temperatura, debido a la notable disminución de la viscosidad al aumentar dicha temperatura; esto lleva consigo que la velocidad de transporte aumente casi lo mismo que la velocidad de reacción, y, por tanto, el factor de efectividad sea tan parecido a diferentes temperaturas. De esta manera, los valores del módulo  $We-Pt > 3$  y del factor de efectividad  $\eta < 1$  sugieren que las limitaciones por transferencia de materia son significativas y, por tanto, debe ser considerada en el modelo cinético.

### **5.1.1.3.- Estudio de los efectos de inhibición y de desactivación**

Como se mencionó en los capítulos 3 y 4, al llevar a cabo la esterificación enzimática, la actividad de la enzima puede estar afectada por la presencia de inhibidores ya sean productos o reactivos de la reacción; debido a esto, se ha realizado un estudio semejante al descrito en los capítulos anteriores, observando el efecto que tienen las concentraciones de ibuprofeno y de agua y de la temperatura en la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno usando la enzima inmovilizada Novozym 435.

#### ***Efecto de la concentración inicial de ibuprofeno y de la temperatura***

El posible efecto inhibidor del reactivo (ibuprofeno) en la esterificación enzimática del ibuprofeno con glicerina se ha estudiado variando la cantidad inicial de ibuprofeno entre 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>. La posible desactivación de la enzima se estudió variando la temperatura entre 50 y 80 °C, manteniendo en todos los casos constantes la concentración de enzima Novozym 435 (30 g·L<sup>-1</sup>). En la Figura 5.5 se puede observar que la velocidad inicial de esterificación disminuye al aumentar la concentración de ibuprofeno (60 y 100 g·L<sup>-1</sup>) para una temperatura de 80 °C. En este sistema, el ibuprofeno, un ácido, puede estar actuando como un agente desactivante, siendo más evidente cuanto mayor es la temperatura. En otros sistemas, como en la obtención de acetato de butilo catalizada por la Novozym 435, la enzima presentó inactivación para una concentración de ácido acético de 0,6 M (Martinsa y col., 2011). Es muy conocido que una alta concentración de ácido puede disminuir el pH microambiental alrededor del centro activo de la lipasa y, por ende, disminuir la actividad enzimática. Por tanto, la desactivación enzimática puede ser debida a la acción sinérgica de la concentración de ibuprofeno y de la temperatura. Este efecto ya fue detectado en otro sistema, de forma más acusada, en la esterificación de glicerina con ácido benzoico (Tamayo y col., 2012). En base a esto, hay que considerar en el estudio cinético la posible desactivación enzimática por sustrato y por temperatura.

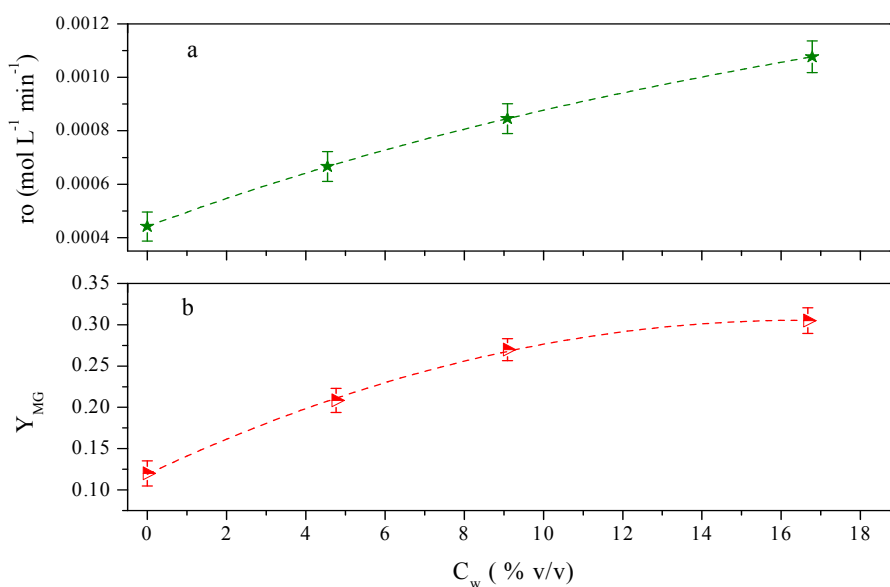


**Figura 5.5.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina e ibuprofeno *versus* la concentración inicial de ibuprofeno

### **Efecto de la concentración de agua**

Como ya se ha comentado, el agua es importante para mantener la flexibilidad e hidratación de la enzima y, por tanto, mantener su actividad y estabilidad. La inhibición por agua, un producto de la esterificación de glicerina e ibuprofeno, se ha estudiado añadiendo agua en el medio en el mismo intervalo que se consideró para el sistema con la enzima libre CALB-L, en el capítulo 3 de esta Memoria, es decir, una adición de agua entre 0 y 16,7 % v/v (13,7 % w/w). La experimentación se llevó a cabo a una velocidad de agitación de 720 rpm, una temperatura de 80 °C y una concentración inicial de ibuprofeno de 100 g·L<sup>-1</sup>, con una concentración de enzima 30 g·L<sup>-1</sup>. En la Figura 5.6a se puede observar que la velocidad inicial de esterificación aumenta a medida que aumenta la concentración de agua en el medio de reacción. Este comportamiento fue observado también en la síntesis de etil oleato usando Novozym 435 (Foresti y col., 2007); también en la esterificación enzimática de ácido benzoico con glicerina empleando Novozym 435 como catalizador (Tamayo, 2014). En ambos trabajos, la adición de agua al medio de reacción mejoró el rendimiento en éster, como también se produjo en este caso y se muestra en la Figura 5.6b.

En el caso en estudio, la adición de agua podría aumentar la flexibilidad e hidratación del biocatalizador, y así mejorar la actividad enzimática, como han sugerido anteriormente otros autores (Foresti y col., 2007; Klibanov, 2001). Otra razón para este efecto puede ser que se reduce la viscosidad de la glicerina en el medio de reacción por la adición de agua, por tanto, se modifica la hidrodinámica del sistema, favoreciendo la transferencia del sustrato y del producto hacia y desde el centro activo de la lipasa. No obstante, la adición de gran cantidad de agua podría facilitar la hidrólisis del éster, por ser la esterificación una reacción reversible. En este caso, puede ser que la glicerina al ser altamente higroscópica y estar en gran exceso, impida la reacción inversa (hidrólisis). Estas observaciones han llevado a abordar el estudio del sistema con la adición de cierta cantidad de agua, como se describirá en detalle en el apartado siguiente de este capítulo.



**Figura 5.6.** a) Velocidad inicial y b) Rendimiento final de esterificación de glicerina e ibuprofeno obtenidos en experimentos realizados con distinta concentración de agua añadida.

### 5.1.2.- Determinación del modelo cinético

En este apartado, se hace la propuesta del modelo cinético y la selección del modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos, de esta manera se da cumplimiento al objetivo 2 al comienzo de este capítulo.

### 5.1.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos

En la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 libre de disolvente, de acuerdo con los experimentos previos, las condiciones de operación elegidas para llevar a cabo los experimentos cinéticos son las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, concentración de enzima de 30 g·L<sup>-1</sup>, velocidad de agitación de 720 rpm y concentración de agua de 0 % v/v, en este apartado. En las Tabla 5.4 se muestran los experimentos realizados, mientras que las Tablas 5.5 a 5.9 muestran los datos experimentales obtenidos en dichos experimentos, para el sistema anhidro.

**Tabla 5.4.** Experimentos realizados para el sistema con enzima inmovilizada (Novozym 435) en ausencia de disolvente orgánico, sin agua añadida

Experimento	C <sub>w</sub> (% v/v)	T (°C)	C <sub>10</sub> (g·L <sup>-1</sup> )
S3E1	0	50	20
S3E2	0	50	60
S3E3	0	50	100
S3E4	0	60	20
S3E5	0	60	60
S3E6	0	60	100
S3E7	0	70	20
S3E8	0	70	60
S3E9	0	70	100
S3E10	0	75	20
S3E11	0	75	60
S3E12	0	75	100
S3E13	0	80	20
S3E14	0	80	60
S3E15	0	80	100

**Tabla 5.5.** Resultados de los experimentos de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con la enzima inmovilizada Novozym 435 a T=50 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S3E1 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S3E2 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S3E3 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.009	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000
20	0.021	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001
30	0.035	0.003	0.004	0.001	0.004	0.002
40	0.050	0.005	0.006	0.002	0.007	0.003
50	0.066	0.006	0.010	0.003	0.010	0.005
60	0.082	0.008	0.014	0.004	0.013	0.006
90	0.132	0.013	0.029	0.008	0.025	0.012
120	0.185	0.018	0.049	0.014	0.039	0.019
140	0.220	0.021	0.064	0.019	0.049	0.024
160	0.254	0.025	0.081	0.024	0.060	0.029
180	0.288	0.028	0.099	0.029	0.072	0.035
200	0.322	0.031	0.119	0.035	0.084	0.041
220	0.355	0.034	0.139	0.040	0.097	0.047
240	0.387	0.038	0.160	0.047	0.110	0.053
260	0.418	0.041	0.181	0.053	0.123	0.060
280	0.448	0.043	0.203	0.059	0.137	0.066
300	0.477	0.046	0.225	0.065	0.151	0.073
320	0.505	0.049	0.248	0.072	0.165	0.080
340	0.532	0.052	0.270	0.079	0.179	0.087
360	0.558	0.054	0.292	0.085	0.194	0.094
380	0.583	0.057	0.314	0.091	0.208	0.101
400	0.607	0.059	0.336	0.098	0.223	0.108
420	0.629	0.061	0.357	0.104	0.238	0.115
480	0.691	0.067	0.419	0.122	0.281	0.136
540	0.743	0.072	0.477	0.139	0.324	0.157
600	0.788	0.076	0.531	0.154	0.366	0.177
660	0.825	0.080	0.580	0.169	0.407	0.197
720	0.856	0.083	0.625	0.182	0.446	0.216
780	0.882	0.086	0.665	0.193	0.483	0.234
840	0.904	0.088	0.702	0.204	0.518	0.251
900	0.915	0.089	0.734	0.213	0.552	0.268
960	0.916	0.089	0.763	0.222	0.583	0.283
1020	0.917	0.089	0.790	0.230	0.613	0.297
1080	0.918	0.089	0.813	0.236	0.641	0.311
1140	0.918	0.089	0.834	0.243	0.667	0.323
1200	0.918	0.089	0.852	0.248	0.691	0.335
1260	0.918	0.089	0.869	0.253	0.714	0.346
1320	0.918	0.089	0.883	0.257	0.735	0.356
1380	0.918	0.089	0.897	0.261	0.755	0.366
1440	0.918	0.089	0.908	0.264	0.773	0.375



**Tabla 5.6.** Resultados de los experimentos de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con la enzima inmovilizada Novozym 435 a T=60 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S3E4 $C_{I0}= 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=60 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S3E5 $C_{I0}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=60 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S3E6 $C_{I0}= 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=60 \text{ }^{\circ}\text{C}$	
	$X_{MG}$	$C_{MG} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$X_{MG}$	$C_{MG} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$X_{MG}$	$C_{MG} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.027	0.003	0.002	0.001	0.003	0.001
20	0.056	0.005	0.005	0.001	0.007	0.003
30	0.087	0.008	0.010	0.003	0.012	0.006
40	0.117	0.011	0.017	0.005	0.018	0.009
50	0.149	0.014	0.026	0.008	0.024	0.012
60	0.180	0.017	0.035	0.010	0.031	0.015
90	0.273	0.026	0.071	0.021	0.055	0.027
120	0.364	0.035	0.115	0.033	0.082	0.040
140	0.423	0.041	0.147	0.043	0.101	0.049
160	0.480	0.047	0.181	0.053	0.121	0.059
180	0.534	0.052	0.216	0.063	0.142	0.069
200	0.585	0.057	0.252	0.073	0.163	0.079
220	0.633	0.061	0.288	0.084	0.184	0.089
240	0.678	0.066	0.324	0.094	0.205	0.099
260	0.719	0.070	0.359	0.104	0.227	0.110
280	0.755	0.073	0.394	0.115	0.248	0.120
300	0.788	0.076	0.427	0.124	0.269	0.130
320	0.817	0.079	0.459	0.134	0.291	0.141
340	0.842	0.082	0.490	0.143	0.312	0.151
360	0.863	0.084	0.520	0.151	0.333	0.161
380	0.880	0.085	0.548	0.159	0.354	0.172
400	0.894	0.087	0.574	0.167	0.374	0.181
420	0.906	0.088	0.600	0.175	0.394	0.191
480	0.929	0.090	0.666	0.194	0.453	0.220
540	0.940	0.091	0.722	0.210	0.508	0.246
600	0.946	0.092	0.766	0.223	0.559	0.271
660	0.948	0.092	0.802	0.233	0.607	0.294
720	0.949	0.092	0.830	0.241	0.651	0.316
780	0.949	0.092	0.853	0.248	0.691	0.335
840	0.950	0.092	0.871	0.253	0.728	0.353
900	0.950	0.092	0.885	0.257	0.762	0.369
960	0.950	0.092	0.896	0.261	0.793	0.384
1020	0.950	0.092	0.905	0.263	0.821	0.398
1080	0.950	0.092	0.912	0.265	0.864	0.419
1140	0.950	0.092	0.917	0.267	0.885	0.429
1200	0.950	0.092	0.921	0.268	0.908	0.440
1260	0.950	0.092	0.924	0.269	0.924	0.448
1320	0.950	0.092	0.927	0.270	0.928	0.450
1380	0.950	0.092	0.929	0.270	0.934	0.453
1440	0.950	0.092	0.930	0.271	0.941	0.456

**Tabla 5.7.** Resultados de los experimentos de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con la enzima inmovilizada Novozym 435 a T=70 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S3E7 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S3E8 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S3E9 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.139	0.013	0.040	0.012	0.013	0.006
20	0.248	0.024	0.078	0.023	0.027	0.013
30	0.340	0.033	0.115	0.033	0.042	0.020
40	0.419	0.041	0.151	0.044	0.058	0.028
50	0.488	0.047	0.185	0.054	0.074	0.036
60	0.548	0.053	0.218	0.063	0.090	0.044
90	0.687	0.067	0.309	0.090	0.138	0.067
120	0.780	0.076	0.390	0.113	0.185	0.090
140	0.824	0.080	0.439	0.128	0.217	0.105
160	0.858	0.083	0.484	0.141	0.247	0.120
180	0.884	0.086	0.525	0.153	0.277	0.134
200	0.904	0.088	0.563	0.164	0.306	0.148
220	0.919	0.089	0.598	0.174	0.335	0.162
240	0.931	0.090	0.631	0.184	0.362	0.175
260	0.940	0.091	0.660	0.192	0.389	0.189
280	0.946	0.092	0.688	0.200	0.414	0.201
300	0.952	0.092	0.712	0.207	0.439	0.213
320	0.956	0.093	0.735	0.214	0.464	0.225
340	0.959	0.093	0.756	0.220	0.487	0.236
360	0.961	0.093	0.775	0.225	0.509	0.247
380	0.963	0.093	0.793	0.231	0.531	0.257
400	0.964	0.093	0.809	0.235	0.552	0.268
420	0.965	0.094	0.824	0.240	0.572	0.277
480	0.967	0.094	0.860	0.250	0.627	0.304
540	0.968	0.094	0.888	0.258	0.676	0.328
600	0.968	0.094	0.909	0.264	0.719	0.349
660	0.968	0.094	0.925	0.269	0.757	0.367
720	0.968	0.094	0.937	0.273	0.789	0.382
780	0.968	0.094	0.946	0.275	0.818	0.397
840	0.968	0.094	0.953	0.277	0.843	0.409
900	0.968	0.094	0.958	0.279	0.864	0.419
960	0.968	0.094	0.961	0.280	0.882	0.428
1020	0.968	0.094	0.964	0.280	0.898	0.435
1080	0.968	0.094	0.966	0.281	0.912	0.442
1140	0.968	0.094	0.968	0.282	0.924	0.448
1200	0.968	0.094	0.969	0.282	0.934	0.453
1260	0.968	0.094	0.970	0.282	0.943	0.457
1320	0.968	0.094	0.971	0.282	0.950	0.461
1380	0.968	0.094	0.971	0.282	0.957	0.464
1440	0.968	0.094	0.972	0.283	0.962	0.466

**Tabla 5.8.** Resultados de los experimentos de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con la enzima inmovilizada Novozym 435 a T=75 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S3E10 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=75 °C		S3E11 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=75 °C		S3E12 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=75 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.140	0.014	0.048	0.014	0.046	0.022
20	0.206	0.020	0.091	0.026	0.079	0.038
30	0.285	0.028	0.131	0.038	0.103	0.050
40	0.359	0.035	0.168	0.049	0.122	0.059
50	0.480	0.047	0.201	0.058	0.137	0.066
60	0.630	0.061	0.233	0.068	0.149	0.072
90	0.775	0.075	0.313	0.091	0.175	0.085
120	0.845	0.082	0.378	0.110	0.192	0.093
140	0.892	0.086	0.416	0.121	0.200	0.097
160	0.911	0.088	0.449	0.131	0.207	0.100
180	0.929	0.090	0.479	0.139	0.212	0.103
200	0.935	0.091	0.505	0.147	0.217	0.105
220	0.942	0.091	0.529	0.154	0.220	0.107
240	0.948	0.092	0.551	0.160	0.224	0.109
260	0.953	0.092	0.572	0.166	0.227	0.110
280	0.957	0.093	0.590	0.172	0.229	0.111
300	0.961	0.093	0.607	0.177	0.231	0.112
320	0.961	0.093	0.623	0.181	0.233	0.113
340	0.962	0.093	0.637	0.185	0.235	0.114
360	0.963	0.093	0.651	0.189	0.237	0.115
380	0.963	0.093	0.663	0.193	0.238	0.115
400	0.963	0.093	0.675	0.196	0.240	0.116
420	0.963	0.093	0.686	0.200	0.241	0.117
480	0.966	0.094	0.715	0.208	0.244	0.118
540	0.966	0.094	0.739	0.215	0.246	0.119
600	0.967	0.094	0.760	0.221	0.249	0.121
660	0.967	0.094	0.778	0.226	0.250	0.121
720	0.968	0.094	0.793	0.231	0.252	0.122
780	0.968	0.094	0.807	0.235	0.253	0.123
840	0.969	0.094	0.819	0.238	0.254	0.123
900	0.969	0.094	0.829	0.241	0.255	0.124
960	0.970	0.094	0.839	0.244	0.256	0.124
1020	0.970	0.094	0.848	0.247	0.256	0.124
1080	0.971	0.094	0.856	0.249	0.257	0.125
1140	0.971	0.094	0.863	0.251	0.258	0.125
1200	0.972	0.094	0.869	0.253	0.258	0.125
1260	0.972	0.094	0.875	0.255	0.258	0.125
1320	0.972	0.094	0.881	0.256	0.259	0.126
1380	0.973	0.094	0.886	0.258	0.259	0.126
1440	0.973	0.094	0.891	0.259	0.260	0.126

**Tabla 5.9.** Resultados de los experimentos de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con la enzima inmovilizada Novozym 435 a T=80 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S3E13 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S3E14 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S3E15 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.240	0.023	0.088	0.025	0.022	0.011
20	0.390	0.038	0.141	0.041	0.040	0.019
30	0.492	0.048	0.178	0.052	0.054	0.026
40	0.567	0.055	0.204	0.059	0.066	0.032
50	0.623	0.060	0.223	0.065	0.071	0.034
60	0.668	0.065	0.239	0.069	0.077	0.037
90	0.758	0.073	0.270	0.078	0.088	0.043
120	0.813	0.079	0.289	0.084	0.098	0.048
140	0.839	0.081	0.297	0.087	0.102	0.049
160	0.860	0.083	0.304	0.089	0.106	0.051
180	0.876	0.085	0.310	0.090	0.108	0.052
200	0.890	0.086	0.315	0.092	0.111	0.054
220	0.902	0.087	0.319	0.093	0.113	0.055
240	0.912	0.088	0.322	0.094	0.115	0.056
260	0.921	0.089	0.325	0.095	0.116	0.056
280	0.928	0.090	0.328	0.095	0.117	0.057
300	0.935	0.091	0.330	0.096	0.118	0.057
320	0.941	0.091	0.332	0.097	0.119	0.058
340	0.946	0.092	0.334	0.097	0.119	0.058
360	0.951	0.092	0.335	0.097	0.120	0.058
380	0.955	0.093	0.337	0.098	0.120	0.058
400	0.959	0.093	0.338	0.098	0.120	0.058
420	0.962	0.093	0.339	0.099	0.120	0.058
480	0.971	0.094	0.342	0.099	0.120	0.058
540	0.973	0.094	0.344	0.100	0.120	0.058
600	0.974	0.094	0.346	0.101	0.120	0.058
660	0.974	0.094	0.348	0.101	0.120	0.058
720	0.976	0.095	0.349	0.102	0.120	0.058
780	0.977	0.095	0.350	0.102	0.120	0.058
840	0.978	0.095	0.351	0.102	0.120	0.058
900	0.978	0.095	0.352	0.102	0.120	0.058
960	0.978	0.095	0.353	0.103	0.120	0.058
1020	0.978	0.095	0.354	0.103	0.120	0.058
1080	0.978	0.095	0.354	0.103	0.120	0.058
1140	0.978	0.095	0.355	0.103	0.120	0.058
1200	0.978	0.095	0.355	0.103	0.120	0.058
1260	0.978	0.095	0.356	0.103	0.120	0.058
1320	0.978	0.095	0.356	0.104	0.120	0.058
1380	0.978	0.095	0.356	0.104	0.120	0.058
1440	0.978	0.095	0.357	0.104	0.120	0.058

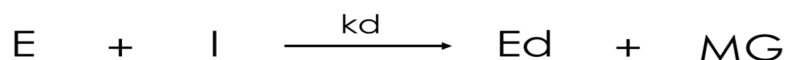
### 5.1.2.2- Formulación del modelo cinético

De manera muy similar a lo realizado en los capítulos 3 y 4 de esta memoria, en este apartado se hace la propuesta de varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno. En la selección del más adecuado, se han ajustado los diferentes modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, comparándolos y discriminando entre ellos según criterios físicos y estadísticos ya comentados en capítulos anteriores. La reacción de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435 en un medio libre de disolvente, se ha llevado a cabo con un exceso de glicerina con respecto a la concentración inicial de ibuprofeno ( $C_{\text{glicerina}} \gg C_{\text{ibuprofeno}}$ ), de igual manera como se ha considerado en los modelos propuestos en el capítulo 3 y 4. En este sistema existen la reacción directa y la hidrólisis, por lo que la ecuación de velocidad de reacción viene dado por la ecuación [3.2] del capítulo 3; además se ha considerado que la concentración de los productos de la reacción de esterificación son iguales ( $C_{\text{agua}} = C_{\text{éster}}$ ), siendo una expresión muy próxima al tipo Michaelis-Menten reversible con un sustrato y producto en cada reacción (directa e inversa) y, además, sin adsorción significativa del monoéster de ibuprofeno, quedando representado por la ecuación [5.12]. En el apartado 5.1.1.2 se realizó el estudio de la influencia de las limitaciones por transferencia de materia interna, siendo el factor de efectividad ( $\eta$ ) a considerar en los modelos cinéticos de 0,11 correspondiente a la fracción de tamaño media.

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{\text{ácido}} - k'_2 \cdot C_{\text{éster}}^2}{1 + K_{\text{ácido}} \cdot C_{\text{ácido}}} \quad [5.12]$$

A diferencia de lo observado al utilizar la lipasa CALB-L como biocatalizador de la reacción en los capítulos 3 y 4, donde la enzima en su forma libre no sufre desactivación por efecto de la concentración del ibuprofeno y la temperatura, en este caso se observa desactivación. Usando la forma inmovilizada de la CALB (Novozym 435), como se ha descrito en la sección de experimentos previos, esta es desactivada por efecto de la concentración del ácido (ibuprofeno) y por la temperatura. En este sentido, se propone un mecanismo de desactivación total irreversible, siendo la velocidad de desactivación proporcional a la concentración de ibuprofeno y a la actividad remanente

( $a_R$ ), el cual se muestra en el siguiente esquema 1, donde E es la concentración de enzima, I es la concentración de ibuprofeno, Ed es la concentración de enzima desactivada y MG es la concentración del monoéster.



**Esquema 1.** Desactivación total de la enzima

En consecuencia con lo anterior, los modelos que se han propuestos para el sistema anhidro son los siguientes:

**Modelo 1:** Un modelo hiperbólico reversible de pseudo-primer orden, con respecto a la concentración de ibuprofeno, y de orden dos con respecto a la concentración de monoglicérido, representado por la ecuación [5.12]; se supone que no hay desactivación química ni térmica.

**Modelo 2:** Un modelo similar al anterior, con la diferencia de que se considera una reacción de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y, además, se asume un mecanismo de desactivación irreversible de la lipasa, mostrado en el esquema 1, siendo la velocidad de reacción de orden 1 respecto a la concentración de ibuprofeno y la velocidad de desactivación de orden 1 respecto a la actividad remanente.

**Modelo 3:** Este modelo también considera la velocidad de desactivación química de orden 1 respecto a ambos, la concentración de ibuprofeno y la actividad remanente. En este modelo se considera la posibilidad de que la solubilidad del ibuprofeno en el medio de reacción aumente con el tiempo de reacción, lo que viene determinado por la influencia de la concentración que reacciona de ibuprofeno ( $C_{IR0}$ ) y, además, por la concentración de monoéster de ibuprofeno ( $C_{MG}$ ) debido a su capacidad surfactante, definida por la ecuación [5.13].

$$S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG} \quad [5.13]$$

donde:  $k_s$  es la constante empleada para describir la solubilidad del ibuprofeno en el medio de reacción.

En la Tabla 5.10 se muestran las ecuaciones de la velocidad para cada uno de los modelos propuestos.

**Tabla 5.10.** Ecuaciones de velocidad para los diferentes modelos cinéticos propuestos

Modelo	Ecuación cinética
1	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$
2	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
3	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_{IR}}$ $S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG}$ $\text{Si } C_I \geq S_{IR} \Rightarrow C_{IR} = S_{IR}$ $\text{Si } C_I < S_{IR} \Rightarrow C_{IR} = C_I$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$

### 5.1.2.3.- Selección del modelo cinético

Como se comentó en el capítulo 3 y 4, se ha aplicado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden y el algoritmo de Marquardt-Levenberg para el ajuste de los modelos a los datos obtenidos. En la Tabla 5.11 se muestra los parámetros cinéticos para cada uno de los modelos cinéticos propuestos para el sistema anhidro. En la selección y discriminación de los modelos propuestos, el primer criterio físico considerado es el rango de valores de la energías de activación ( $E_a$ ) de la constante cinética, que se muestra en la Tabla 5.11; los modelos 1, 2 y 3 en la reacción de hidrólisis (reversa) las constantes cinéticas tienen una energía de activación de 343; 88,8 y 79,5 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. En cuanto a los valores de las constantes cinéticas de la reacción directa, los modelos tienen energía de activación entre 51 y 65 kJ mol<sup>-1</sup>. Así, el modelo 1 el valor de energía de activación de la reacción de hidrólisis no se encuentra dentro del intervalo de 2-200 kJ mol<sup>-1</sup> considerado en los modelos cinéticos para reacciones químicas. Otro criterio aplicado fue el signo positivo en todas las constantes de adsorción o de equilibrio, que se alcanzó para todos los modelos propuestos, como puede observarse en la Tabla 5.11, los valores de las constantes son positivos para todos los modelos propuestos. Por lo tanto, la discriminación de los modelos ha de ser realizada únicamente sobre la base de criterios estadísticos, ya que los criterios físicos se cumplen en los modelos 2 y 3. El primer

criterio estadístico considerado es el valor absoluto del error estándar (Tabla 5.11), y éste se mantiene bajo para todas las constantes cinéticas y termodinámicas de los modelos propuestos, por lo que, al 95 % de confianza, el cero no es una solución en ningún caso (intervalos de confianza estrechos). Considerando el parámetro p para todos los modelos propuestos, su valor es  $p < 0.0001$ , como se ha apreciado en los modelos cinéticos propuestos para la esterificación de glicerina con ibuprofeno usando la lipasa CALB-L en su forma libre en medio libre de disolvente y con cosolvente (Capítulo 3 y 4). En cuanto a otros criterios estadísticos de discriminación (Tabla 5.12), los valores más bajos del criterio de información de Akaike ( $AIC_c$ ) y del criterio de información bayesiano (BIC) son los del Modelo 3, mientras que el valor de F más alto es del modelo 3 y el porcentaje de variación explicada (%VE) es más alto en el modelo 3.

**Tabla 5.11.** Valores físicos con error estándar para cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno para el sistema anhidro

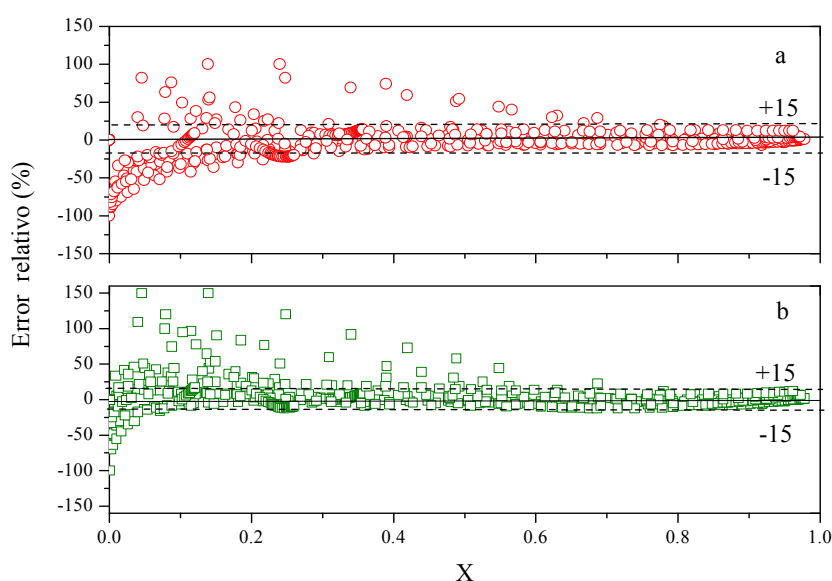
Modelo	Parámetro	Valor	Error
1	$\ln k'_{10}$	10.87	0.84
	$E_{a_{k'1}}/R$	6145	272
	$\ln k'_{20}$	112.70	6.74
	$E_{a_{k'2}}/R$	41305	2364
	$K_I$	29.95	5.61
2	$\ln k'_{10}$	13.14	0.32
	$E_{a_{k'1}}/R$	6999	107
	$\ln k'_{20}$	22.57	3.88
	$E_{a_{k'2}}/R$	10679	1311
	$\ln k_{d0}$	85.43	1.86
	$E_{a_{kd}}/R$	33111	654
	$K_I$	17.97	1.02
3	$\ln k'_{10}$	<b>15.45</b>	<b>0.44</b>
	$E_{a_{k'1}}/R$	<b>7800</b>	<b>148</b>
	$\ln k'_{20}$	<b>19.58</b>	<b>2.35</b>
	$E_{a_{k'2}}/R$	<b>9562</b>	<b>794</b>
	$\ln k_{s0}$	<b>-31.3</b>	<b>2.45</b>
	$E_{a_{ks}}/R$	<b>-10610</b>	<b>812</b>
	$\ln k_{d0}$	<b>89.13</b>	<b>1.97</b>
	$E_{a_{kd}}/R$	<b>32408</b>	<b>690</b>
	$K_I$	<b>11.14</b>	<b>0.58</b>

**Tabla 5.12.** Valores estadísticos de cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno para el sistema anhidro

Modelo	F-Fisher	$N_{dexp}$	K	RSS	$AIC_c$	BIC	RMSE	VE (%)
1	2517	615	5	10.82	-2474	-2485	0.13	85.56
2	10863	615	7	1.18	-3833	-3847	0.06	98.43
3	<b>13995</b>	<b>615</b>	<b>9</b>	<b>0.88</b>	<b>-4010</b>	<b>-4028</b>	<b>0.04</b>	<b>98.82</b>



En las Figuras 5.7 a y b se muestra la evolución del error relativo *versus* la conversión de ibuprofeno del modelo 2 y modelo 3, respectivamente, para todos los datos de los experimentos realizados del sistema anhidro. Como puede observarse, en el modelo 2 y 3, existe un buen número de datos experimentales que se encuentra dentro de la banda de error  $\pm 15\%$ ; sin embargo, se puede apreciar que por debajo de un valor de conversión de 0,2 se presenta una sobreestimación con respecto a los datos experimentales para los valores negativos y positivos del error relativo, siendo relativamente mayor en el modelo 3 para los valores positivos del error. De igual manera, en el intervalo  $0,2 > X < 0,6$  se presenta en los valores positivos del error relativo una sobreestimación en los datos experimentales. Así, tanto el modelo 2 como el modelo 3 tienen una buena bondad de ajuste en los intervalos estrechos para las constantes cinéticas, al igual que los otros parámetros estadísticos, de hecho el error relativo en ambos modelos parece tener el mismo valor.



**Figura 5.7.** Error relativo versus la conversión para: a) Modelo 2 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno y b) Modelo 3 sigmoidal reversible pseudo-orden 1 para ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno

Por lo anteriormente mencionado, el mejor modelo de los propuestos para el sistema anhidro, es el modelo 3, el cual sugiere un modelo sigmoidal reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y orden 2 con respecto a la concentración de monoéster con desactivación química total de orden 1

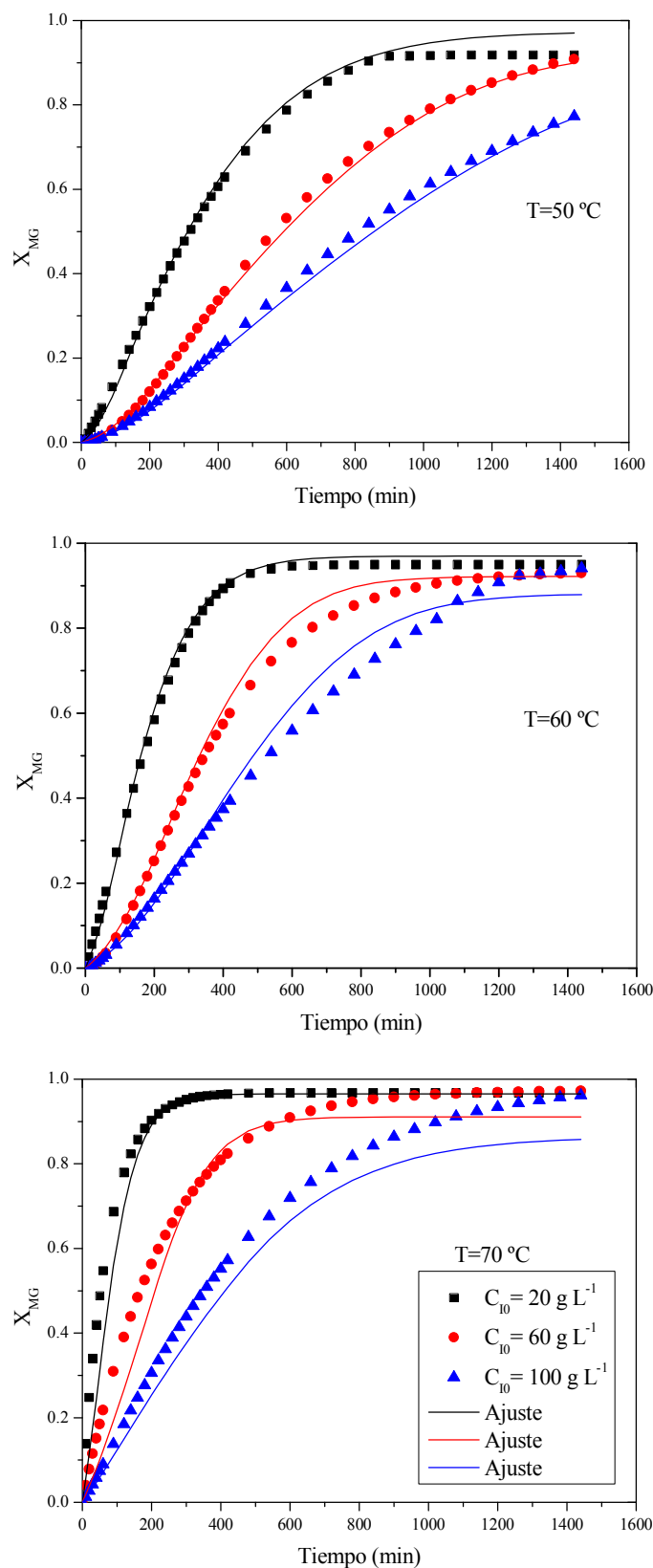
respecto al ibuprofeno, siendo representado en las ecuaciones [5.14] a [5.16], donde se incluyen el valor de los parámetros y sus intervalos de confianza.

$$r = \frac{\exp\left(15,14 \pm 0,44 - \frac{7800 \pm 148}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - \exp\left(19,58 \pm 2,35 - \frac{9562 \pm 794}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + (11,14 \pm 0,58) \cdot C_{IR}} \quad [5.14]$$

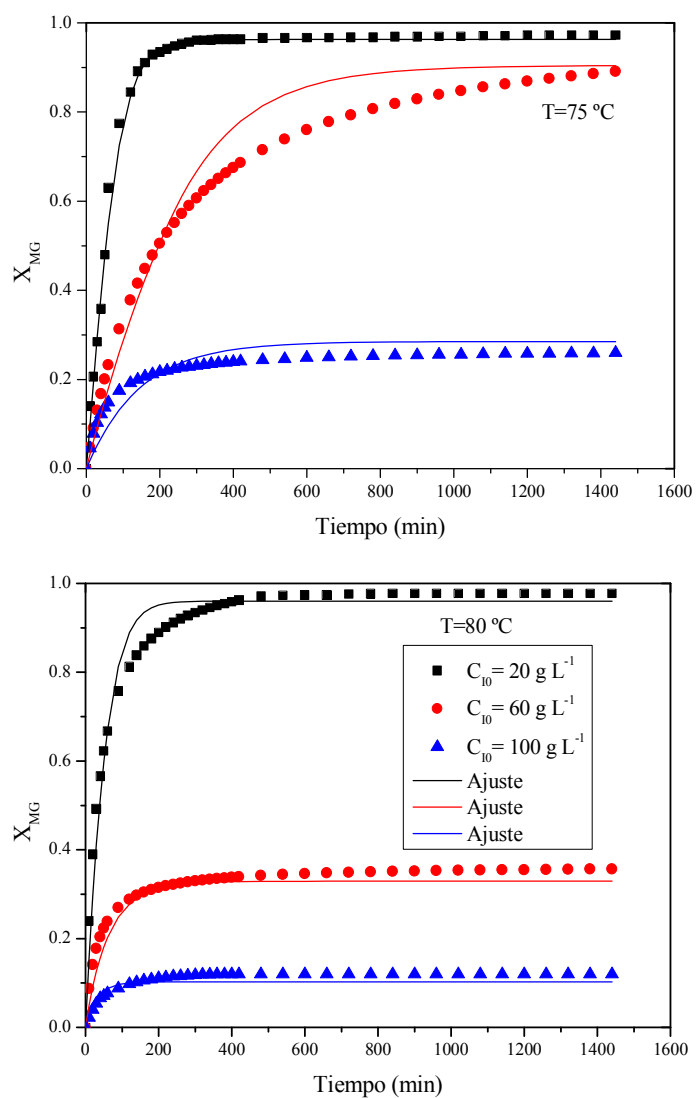
$$S_{IR} = C_{IR} + \exp\left(31,3 \pm 2,45 + \frac{10610 \pm 812}{T}\right) \cdot C_{MG} \quad [5.15]$$

$$-\frac{da_R}{dt} = \exp\left(89,13 \pm 1,97 - \frac{32408 \pm 690}{T}\right) \cdot a_R \cdot C_I \quad [5.16]$$

En las Figuras 5.8 y 5.9 se puede observar el ajuste del Modelo 3 a los datos experimentales para todas las concentraciones iniciales de ibuprofeno y todas las temperaturas estudiadas para el sistema sin adición de agua (“anhidro”). Como se puede observar, para una concentración de ibuprofeno de 20 g·L<sup>-1</sup> el modelo presenta un buen ajuste a los datos experimentales a las temperaturas estudiadas; sin embargo se puede apreciar que a una temperatura de 50 °C, por encima de 800 min el modelo produce una sobrestimación de la conversión en comparación con los datos experimentales. Sucede lo mismo a una temperatura de 80 °C, pero en este caso para un tiempo por encima de 100 min. A una temperatura de 60 °C, y partiendo de una concentración inicial de ibuprofeno de 60 g·L<sup>-1</sup> y 100 g·L<sup>-1</sup>, a tiempos bajos de reacción el modelo, de nuevo, presenta un buen ajuste de los datos experimentales, pero por encima de 400 min hay desviaciones del modelo respecto a los datos experimentales, y lo mismo se aprecia a las temperaturas de 70 y 75 °C. Estas ligeras desviaciones pueden ser debidas a que se ha infravalorado el peso de la acción surfactante (aumento de la solubilidad del ibuprofeno) como consecuencia de la formación del producto de reacción, el monoéster.



**Figura 5.8.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno para el sistema anhidro a una temperatura de 50, 60 y 70 °C



**Figura 5.9.** Ajuste del Modelo 3 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno para el sistema anhidro a una temperatura de 75 y 80 °C

## 5.2.- ESTUDIO del SISTEMA con ADICIÓN de AGUA

### 5.2.1.- Experimentos previos

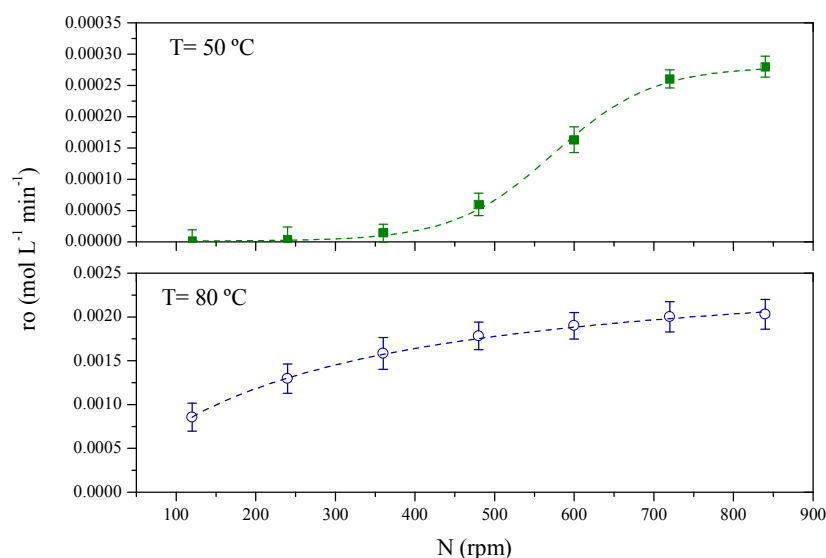
Como resultado de los experimentos llevados a cabo en el estudio de la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno añadiendo una cierta cantidad de agua, se decidió evaluar el efecto de la presencia del agua en la velocidad de reacción, en la velocidad de transferencia de materia, así como sobre la desactivación enzimática, por lo tanto, su influencia en la velocidad global del proceso. En este estudio, se fijó la concentración de enzima en un valor de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , dicho valor se determinó como adecuado en la experimentación previa en el caso del sistema anhidro, sin adición de agua.

#### 5.2.1.1- Estudio de la transferencia de materia

##### *Transferencia de Materia Externa*

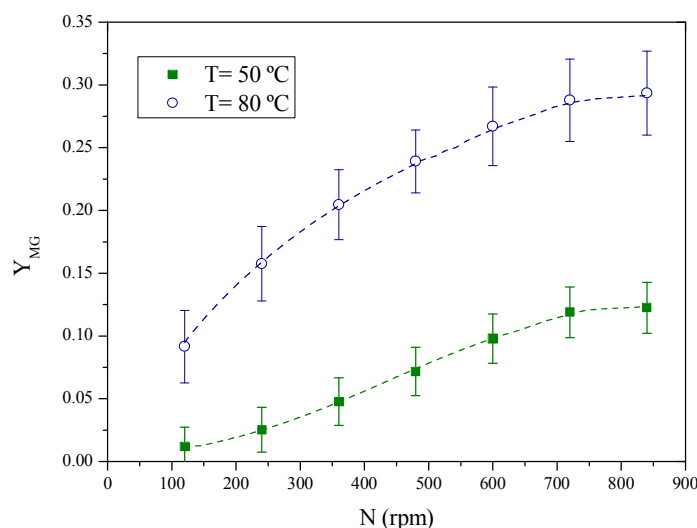
Para considerar la influencia de la velocidad de agitación en la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435, se emplearon las mismas condiciones de operación planteadas en el sistema sin agua añadida, en el apartado 5.1.1.2; es decir, temperaturas de  $50^\circ\text{C}$  y  $80^\circ\text{C}$  y velocidad de agitación entre 120 y 840 rpm. Como puede observarse en la Figura 5.10, la velocidad inicial de esterificación aumenta con el aumento de la velocidad agitación. En este caso la viscosidad de la glicerina disminuye al añadirle una concentración de agua del 16,7 % v/v, así como por el efecto de la temperatura. A pesar de esto, se observa que los valores de velocidad inicial obtenidos al agregar una cierta cantidad de agua al medio de reacción son muy parecidos a los alcanzados en el sistema anhidro “sin agua”. Sin embargo, como puede apreciarse en la Figura 5.11, la presencia de agua provoca una ligera mejora en el rendimiento final del monoéster de ibuprofeno (MG). De manera similar a lo que fue determinado para el sistema anterior, para este sistema también se considera que las posibles limitaciones del transporte de materia externas no son significativas a partir de 720 rpm y la cantidad del monoéster de ibuprofeno (MG) formado es independiente de la velocidad de agitación para ésta y más altas velocidades de agitación.

De la misma manera que en el sistema previo, se determinó el criterio de Mears (ecuaciones [5.1] a [5.5]), para corroborar si en estas condiciones se pueden despreciar las limitaciones debidas a la transferencia de materia externa.



**Figura 5.10.** Efecto de la velocidad de agitación en la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno.

Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=50 \text{ y } 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_w=16,7 \text{ \% v/v}$



**Figura 5.11.** Efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento de esterificación de glicerina con ibuprofeno.

Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=50 \text{ y } 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_w=16,7 \text{ \% v/v}$

En la Tabla 5.13 se muestran los valores de la difusividad molecular ( $D_{ij}$ , ecs. [5.6] y [5.7]) y los valores de la viscosidad de la mezcla glicerina-agua. Al agregar una cierta cantidad de agua los valores de viscosidad disminuyen notablemente con respecto al caso anhidro (Tabla 5.1); de hecho, a una temperatura de  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  la viscosidad de la mezcla glicerina-agua es 12 veces más bajo que en el sistema sin agua; a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , es 4 veces más bajo; mientras que a temperaturas de  $70 \text{ y } 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , la viscosidad de la glicerina con agua es 3 veces más pequeña que la viscosidad de la glicerina en ausencia de agua. En

cuanto a la difusividad molecular ( $D_{ij}$ ) para el sistema con agua, la  $D_{ij}$  es mayor con respecto al sistema anhidro (Tabla 5.1), debido al efecto de la disminución de la viscosidad ya comentado. Por otra parte, como se puede apreciar en la Tabla 5.18, la adición de cierta cantidad de agua lleva a un aumento en los valores de velocidad inicial de esterificación ( $r_{obs}$ ), siendo 1,3 veces más altos en comparación con el sistema anhidro (Tabla 5.2). La presencia de agua trae como consecuencia un aumento mayor en la velocidad de transferencia de materia ( $k_L a C_{I0}$ ) que en la velocidad inicial de esterificación (Tabla 5.14), debido a la gran disminución de la viscosidad de la glicerina al agregar agua, con la mejora del transporte de materia. Al comparar los valores de  $k_L a C_{I0}$  del sistema con agua con el sistema anhidro (Tabla 5.2), se puede observar que los valores del sistema con agua, a una temperatura de 50 °C son 3,3 más bajos que en el sistema anhidro; sin embargo, a una temperatura de 70 °C, son 2,4 veces más pequeños que en el sistema sin agua. De esta manera, como en el caso del sistema anhidro, los valores del número de Mears son mucho menores que 0,15, debido a que la velocidad de transferencia de materia ( $k_L a C_{I0}$ ) es mucho mayor que la velocidad de esterificación. Por lo tanto, las limitaciones a la velocidad del proceso global por la transferencia de materia externa son insignificantes para en el intervalo de condiciones de experimentación utilizadas. Se ha fijado un valor de la velocidad de agitación de 720 rpm, al igual que en el sistema sin añadir agua, para la realización de la experimentación posterior.

**Tabla 5.13.** Valores de la difusividad molecular y la viscosidad de la mezcla glicerina-agua estimadas en el intervalo de temperatura de operación del sistema

T(°C)	$D_{ij} \times 10^{11} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$	$\mu_m \text{ (kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$
50	6.89	0.035
60	12.2	0.020
70	14.7	0.017
80	22.8	0,012

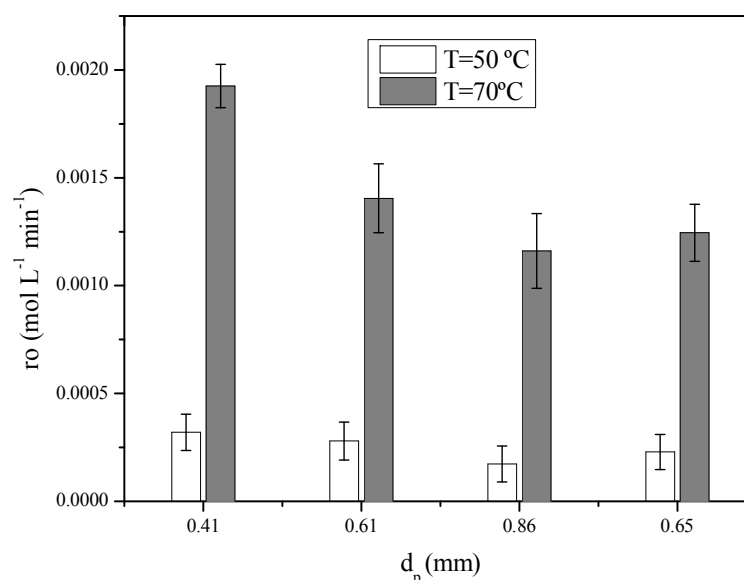
**Tabla 5.14.** Aplicación del criterio de Mears a distintas temperaturas y concentraciones iniciales de ibuprofeno cuando varía la velocidad de agitación empleada para los extremos del intervalo de la temperatura

T (°C)	N (rpm)	$r_{obs} \times 10^4 \text{ (mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$k_L a C_{I0} \text{ (mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	Me $\times 10^5$
50	600	1.52	2.87	2.65
	720	1.91	3.15	3.03
	840	1.97	3.40	2.90
80	600	15.2	7.73	9.83
	720	16.2	8.47	9.57
	840	16.2	9.15	8.86

### Transferencia de Materia Interna

Como en el estudio de la influencia de las limitaciones de transferencia de materia interna en el sistema anhidro, se ha considerado el efecto del tamaño de partícula del biocatalizador usando las mismas fracciones consideradas en el sistema anhidro, obtenidas por tamizado: 0,32-0,5; 0,5-0,7 y 0,7-1 mm. En los experimentos con estas fracciones de enzima inmovilizada, se emplearon las siguientes condiciones de operación:  $C_{I0}=60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T= 50 \text{ y } 70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $N=720 \text{ rpm}$  y  $C_w=16,7 \text{ \% v/v}$ .

En la Figura 5.12 se muestra la velocidad inicial de esterificación frente a los distintos diámetros de partícula medio ( $d_p$ ) empleados para cada una de las temperaturas consideradas. Como se puede apreciar, a medida que aumenta el tamaño de partícula disminuye la velocidad inicial de esterificación; por tanto, deben existir problemas de difusión en el interior de la partícula del biocatalizador, el mismo comportamiento observado en el sistema anhidro. Por otra parte, la presencia de una concentración de agua del 16,7 % v/v provoca que la velocidad inicial de esterificación alcance unos valores más altos para cada una de las fracciones de tamaños de partícula utilizadas en comparación con el sistema sin agua añadida (Figura 5.4).



**Figura 5.12.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno *versus* distintos tamaños de partículas de Novozym 435 para el sistema con agua, a temperaturas de 50 y 70 °C

De una manera similar al apartado anterior, se procedió a comprobar la posible existencia de limitaciones por difusión interna determinando el factor de efectividad ( $\eta$ ) utilizando las ecuaciones [5.8] a [5.9], siguiendo el mismo procedimiento del sistema



anhidro, apartado 5.1.2. En la Tabla 5.15 se muestran los valores de factor de efectividad ( $\eta$ ), coeficiente de difusión efectivo ( $D_e$ ) y módulo We-Pt, para las dos temperaturas consideradas. Se puede observar, como en el caso anterior (sistema anhidro), que los valores del factor de efectividad disminuyen ligeramente con la temperatura y alcanzan valores entre 0,08 y 0,18. Además, el hecho de agregar una cierta cantidad de agua no lleva a cambios significativos en los valores del factor de efectividad, en el sistema anhidro el factor de efectividad se encuentra entre 0,09 y 0,12 (Tabla 5.3).

Para este sistema con agua, también se determinó el módulo de Weisz-Prater (ecuación [5.10]) y, previamente, los valores del coeficiente de difusión efectivo ( $D_e$ , por medio de la ecuación [5.11]), para su determinación se ha considerado los mismos valores del sistema anhidro, relación  $\sigma/\tau$  de 0,016 y la porosidad 0,5. En la Tabla 5.15, como se puede observar, los valores del módulo de Weisz-Prater son mayores a la unidad ( $We-Pt > 1$ ) y, aumentan significativamente con la temperatura, siendo, en general, mayores de 3 ( $We-Pt > 3$ ). Al adicionar una concentración de agua de 16,7% v/v, aumenta la velocidad inicial de esterificación, también lo hacen los valores del coeficiente de difusión efectivo ( $D_e$ ), y ambas magnitudes aumentan con la temperatura. El aumento de la velocidad de reacción es esperable, y el aumento de la velocidad de transporte se debe a la notable disminución de la viscosidad al añadir una cierta cantidad de agua. Como ya sucedió en el sistema anterior, la velocidad de transporte aumenta prácticamente lo mismo que la velocidad de reacción, y, por tanto, el factor de efectividad toma un valor muy parecido a diferentes temperaturas. En cuanto a los valores del módulo de We-Pt a una temperatura de 50 °C se encuentra en el intervalo  $0,3 < We-Pt < 3$ , mientras que, a 70 °C el módulo de We-Pt  $> 3$ , esto sugiere que también en el sistema con agua las limitaciones por transferencia de materia interna son significativas y, por tanto, tienen que ser consideradas en el modelo cinético. Ahora bien, comparando el módulo de We-Pt del sistema con agua y el sistema anhidro (Tabla 5.3), se observa que los valores del módulo de We-Pt en el sistema con agua a una temperatura de 50 °C se encuentra entre 1,0 y 2,3, sin embargo, para el sistema sin agua añadida a la misma temperatura varía entre 3,7 y 9,3. Esta disminución en el módulo de We-Pt es debida a la presencia de una cierta concentración de agua en el medio de reacción que permite disminuir la viscosidad de la glicerina y, por ende, aumenta la difusividad molecular ( $D_{ij}$ ) y el coeficiente difusivo efectivo ( $D_e$ ). Se puede apreciar que a una temperatura de 50 °C, el valor de  $D_{ij}$  en el sistema con agua es 3,6 veces más alto que en el sistema previo. Este mismo

comportamiento se observa en el sistema con agua a una temperatura de 70 °C, el módulo de We-Pt disminuye con respecto al sistema anhidro, como consecuencia de que los valores de  $D_{ij}$  y  $D_e$  en este sistema con agua son 3 veces más altos que en el anterior.

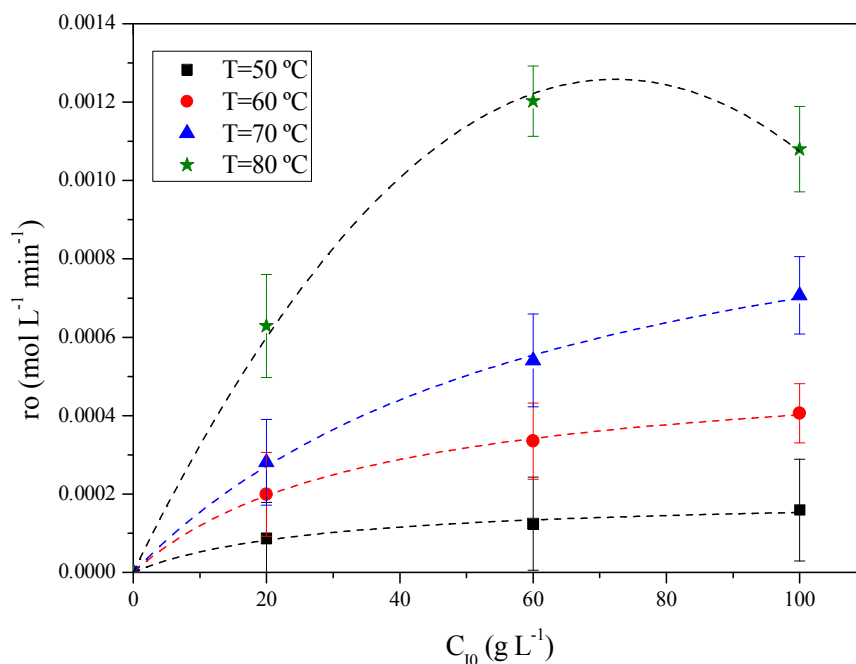
**Tabla 5.15.** Valores del coeficiente difusivo, factor de efectividad y módulo de We-Pt a distintas temperaturas a 50 y 70 °C para el sistema con agua

T (°C)	$D_{ij} \times 10^{11}$ ( $m^2 s^{-1}$ )	$D_e \times 10^{13}$ ( $m^2 s^{-1}$ )	Fracción % w/w	Tamaño partícula (mm)	$r_{obs} \times 10^4$ Novozym 435 ( $mol L^{-1} min^{-1}$ )	$\eta$	We-Pt
50	6.89	5.51	13	0.32-0.5	2.24	0.18	1.0
			52	0.5-0.7	1.96	0.15	1.9
			35	0.7-1	1.21	0.09	2.3
			Media	0.3-1	1.60	0.13	1.8
70	14.7	11.8	13	0.32-0.5	12.4	0.14	2.5
			52	0.5-0.7	9.80	0.10	4.3
			35	0.7-1	8.16	0.08	7.3
			Media	0.3-1	8.68	0.09	4.5

#### 5.2.1.2.- Efecto de la concentración de ibuprofeno y de la temperatura

El posible efecto inhibitor del reactivo (ibuprofeno) en la esterificación enzimática del ibuprofeno con la glicerina agregando una concentración de agua del 16,7 %v/v al comienzo de la reacción fue estudiado variando la cantidad inicial de ibuprofeno entre 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>. Mientras que, la posible desactivación de la enzima por temperatura se estudió en el intervalo de temperatura entre 50 a 80 °C, manteniendo en todos los casos constantes la concentración de enzima CALB-L (30 g·L<sup>-1</sup>). En la Figura 5.13, se puede apreciar que, a temperaturas de 50, 60 y 70 °C, la velocidad inicial de la esterificación se incrementa con la concentración inicial de ibuprofeno, de esta manera, ningún efecto de desactivación por temperatura y concentración de ibuprofeno fue observado a esas temperaturas. Sin embargo, a una temperatura de 80 °C, se observa que la velocidad inicial de reacción pasa por un máximo de concentración inicial de ibuprofeno (60 g·L<sup>-1</sup>) a partir del cual comienza a disminuir hasta llegar a un mínimo para una concentración de 100 g·L<sup>-1</sup>. En este sentido, la enzima parece no estar siendo inhibida por el ibuprofeno, debido a que el valor máximo de concentración debería ser el mismo independiente de la temperatura, pero en este caso no sucede esto, el ibuprofeno puede estar actuando como un agente desactivante, siendo más evidente cuanto mayor es la temperatura. Como fue considerado en el sistema sin agua añadida, la desactivación de la enzima en el sistema

con agua también parece debida a la sinergia de la concentración de ibuprofeno y la temperatura, como ya se ha descrito que ha sido observado para otros sistemas de esterificación similares (Tamayo, 2014). Por lo tanto, este efecto de desactivación ha de considerarse en el modelo cinético.



**Figura 5.13.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina e ibuprofeno *versus* la concentración inicial de ibuprofeno para el sistema con agua

## 5.2.2.- Determinación del modelo cinético

De una forma similar a lo descrito en el apartado anterior, a continuación se hace la propuesta del modelo cinético y la selección del modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos para el sistema con una cierta concentración de agua.

### 5.2.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos

En la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 libre de disolvente, de acuerdo con los experimentos previos, las condiciones de operación empleadas para los experimentos que tienen como objeto determinar un modelo cinético son las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, intervalo de concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, concentración de enzima fija en 30 g·L<sup>-1</sup>, velocidad de agitación de 720 rpm y concentración de agua de 16,7 % v/v. En la Tabla 5.16 se muestran los experimentos realizados, mientras que las

Tablas 5.17 a 5.20 muestran los resultados de estos experimentos para el sistema con una concentración de agua de 16,7 % v/v.

**Tabla 5.16.** Experimentos realizados para el sistema con enzima inmovilizada (Novozym 435) en ausencia de disolvente orgánico con agua añadida

<b>Experimento</b>	<b>C<sub>w</sub> (% v/v)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>C<sub>10</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>
S3E16	16.7	50	20
S3E17	16.7	50	60
S3E18	16.7	50	100
S3E19	16.7	60	20
S3E20	16.7	60	60
S3E21	16.7	60	100
S3E22	16.7	70	20
S3E23	16.7	70	60
S3E24	16.7	70	100
S3E25	16.7	80	20
S3E26	16.7	80	60
S3E27	16.7	80	100

**Tabla 5.17.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=50 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S3E16 C <sub>10</sub> = 20 g L <sup>-1</sup> T=50 °C		S3E17 C <sub>10</sub> = 60 g L <sup>-1</sup> T=50 °C		S3E18 C <sub>10</sub> = 100 g L <sup>-1</sup> T=50 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.009	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000
20	0.027	0.003	0.004	0.001	0.004	0.002
30	0.039	0.004	0.008	0.002	0.007	0.003
40	0.049	0.005	0.013	0.004	0.011	0.005
60	0.059	0.006	0.025	0.007	0.020	0.010
90	0.092	0.009	0.045	0.013	0.036	0.017
120	0.114	0.011	0.067	0.019	0.054	0.026
150	0.159	0.015	0.091	0.026	0.072	0.035
180	0.177	0.017	0.116	0.034	0.090	0.044
240	0.235	0.023	0.166	0.048	0.128	0.062
300	0.349	0.034	0.216	0.063	0.166	0.080
360	0.405	0.039	0.266	0.077	0.204	0.099
480	0.502	0.049	0.361	0.105	0.279	0.135
540	0.545	0.053	0.406	0.118	0.315	0.153
600	0.604	0.059	0.449	0.131	0.350	0.170
660	0.625	0.061	0.491	0.143	0.385	0.187
720	0.669	0.065	0.530	0.154	0.418	0.203
780	0.704	0.068	0.567	0.165	0.451	0.219
840	0.720	0.070	0.601	0.175	0.483	0.234
900	0.744	0.072	0.634	0.184	0.513	0.249
960	0.763	0.074	0.665	0.193	0.543	0.263
1020	0.792	0.077	0.693	0.202	0.572	0.277
1080	0.792	0.077	0.720	0.209	0.599	0.290
1140	0.811	0.079	0.744	0.216	0.626	0.303
1200	0.822	0.080	0.767	0.223	0.651	0.316
1260	0.831	0.081	0.788	0.229	0.675	0.327
1320	0.842	0.082	0.807	0.235	0.698	0.338
1380	0.849	0.082	0.824	0.240	0.720	0.349
1440	0.849	0.082	0.840	0.244	0.741	0.359

**Tabla 5.18.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=60 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S3E19 C <sub>10</sub> = 20 g L <sup>-1</sup> T=60 °C		S3E20 C <sub>10</sub> = 60 g L <sup>-1</sup> T=60 °C		S3E21 C <sub>10</sub> = 100 g L <sup>-1</sup> T=60 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.033	0.003	0.020	0.006	0.010	0.005
20	0.069	0.007	0.040	0.012	0.030	0.015
30	0.105	0.010	0.070	0.020	0.040	0.019
40	0.139	0.013	0.090	0.026	0.060	0.029
60	0.206	0.020	0.180	0.052	0.090	0.044
90	0.302	0.029	0.200	0.058	0.130	0.063
120	0.389	0.038	0.240	0.070	0.180	0.087
150	0.478	0.046	0.300	0.087	0.210	0.102
180	0.548	0.053	0.350	0.102	0.260	0.126
240	0.662	0.064	0.460	0.134	0.320	0.155
300	0.754	0.073	0.550	0.160	0.400	0.194
360	0.789	0.076	0.620	0.180	0.460	0.223
480	0.864	0.084	0.740	0.215	0.580	0.281
540	0.912	0.088	0.780	0.227	0.630	0.305
600	0.924	0.090	0.810	0.236	0.690	0.334
660	0.941	0.091	0.850	0.247	0.730	0.354
720	0.954	0.092	0.890	0.259	0.750	0.364
780	0.958	0.093	0.910	0.265	0.800	0.388
840	0.957	0.093	0.920	0.268	0.830	0.402
900	0.961	0.093	0.940	0.273	0.850	0.412
960	0.964	0.093	0.950	0.276	0.880	0.427
1020	0.966	0.094	0.950	0.276	0.890	0.431
1080	0.966	0.094	0.950	0.276	0.910	0.441
1140	0.966	0.094	0.960	0.279	0.920	0.446
1200	0.964	0.093	0.960	0.279	0.940	0.456
1260	0.961	0.093	0.960	0.279	0.940	0.456
1320	0.967	0.094	0.970	0.282	0.940	0.456
1380	0.968	0.094	0.970	0.282	0.950	0.461
1440	0.969	0.094	0.970	0.282	0.950	0.461

**Tabla 5.19.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=70 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S3E22 C <sub>10</sub> = 20 g L <sup>-1</sup> T=70 °C		S3E23 C <sub>10</sub> = 60 g L <sup>-1</sup> T=70 °C		S3E24 C <sub>10</sub> = 100 g L <sup>-1</sup> T=70 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.080	0.008	0.033	0.010	0.014	0.007
20	0.154	0.015	0.070	0.020	0.034	0.016
30	0.223	0.022	0.107	0.031	0.048	0.023
40	0.286	0.028	0.145	0.042	0.061	0.030
60	0.398	0.039	0.218	0.064	0.099	0.048
90	0.537	0.052	0.322	0.094	0.171	0.083
120	0.645	0.063	0.415	0.121	0.227	0.110
150	0.728	0.071	0.499	0.145	0.297	0.144
180	0.792	0.077	0.574	0.167	0.345	0.167
240	0.876	0.085	0.697	0.203	0.412	0.200
300	0.924	0.090	0.789	0.229	0.495	0.240
360	0.951	0.092	0.855	0.249	0.564	0.273
480	0.968	0.094	0.935	0.272	0.671	0.325
540	0.971	0.094	0.939	0.273	0.712	0.345
600	0.968	0.094	0.943	0.274	0.743	0.360
660	0.971	0.094	0.946	0.275	0.773	0.375
720	0.974	0.094	0.951	0.277	0.812	0.394
780	0.976	0.095	0.953	0.277	0.832	0.403
840	0.983	0.095	0.955	0.278	0.865	0.419
900	0.988	0.096	0.965	0.281	0.872	0.423
960	0.976	0.095	0.962	0.280	0.884	0.429
1020	0.985	0.096	0.968	0.282	0.889	0.431
1080	0.986	0.096	0.969	0.282	0.896	0.434
1140	0.987	0.096	0.965	0.281	0.901	0.437
1200	0.985	0.095	0.965	0.281	0.904	0.438
1260	0.987	0.096	0.964	0.280	0.912	0.442
1320	0.985	0.095	0.966	0.281	0.915	0.444
1380	0.989	0.096	0.968	0.282	0.918	0.445
1440	0.987	0.096	0.970	0.282	0.928	0.450

**Tabla 5.20.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=80 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S3E25 C <sub>10</sub> = 20 g L <sup>-1</sup> T=80 °C		S3E26 C <sub>10</sub> = 60 g L <sup>-1</sup> T=80 °C		S3E27 C <sub>10</sub> = 100 g L <sup>-1</sup> T=80 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.065	0.006	0.021	0.006	0.054	0.026
20	0.164	0.016	0.083	0.024	0.098	0.047
30	0.297	0.029	0.201	0.059	0.132	0.064
40	0.424	0.041	0.236	0.069	0.161	0.078
60	0.533	0.052	0.315	0.092	0.203	0.099
90	0.680	0.066	0.437	0.127	0.244	0.118
120	0.794	0.077	0.502	0.146	0.268	0.130
150	0.888	0.086	0.554	0.161	0.282	0.137
180	0.930	0.090	0.605	0.176	0.291	0.141
240	0.956	0.093	0.670	0.195	0.300	0.145
300	0.971	0.094	0.714	0.208	0.303	0.147
360	0.976	0.095	0.750	0.218	0.305	0.148
480	0.983	0.095	0.797	0.232	0.305	0.148
540	0.983	0.095	0.806	0.234	0.305	0.148
600	0.983	0.095	0.809	0.235	0.305	0.148
660	0.983	0.095	0.812	0.236	0.305	0.148
720	0.980	0.095	0.815	0.237	0.305	0.148
780	0.980	0.095	0.818	0.238	0.305	0.148
840	0.974	0.094	0.827	0.241	0.305	0.148
900	0.980	0.095	0.821	0.239	0.305	0.148
960	0.976	0.095	0.832	0.242	0.305	0.148
1020	0.980	0.095	0.830	0.241	0.305	0.148
1080	0.974	0.094	0.835	0.243	0.305	0.148
1140	0.974	0.094	0.827	0.241	0.305	0.148
1200	0.985	0.096	0.839	0.244	0.305	0.148
1260	0.976	0.095	0.819	0.238	0.305	0.148
1320	0.976	0.095	0.825	0.240	0.305	0.148
1380	0.974	0.094	0.825	0.240	0.305	0.148
1440	0.977	0.095	0.825	0.240	0.305	0.148



### 5.2.2.2- Formulación del modelo cinético

En esta sección se hace la propuesta de varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno catalizada por la Novozym 435 sin cosolvente y con una concentración inicial de agua añadida del 16,7 %v/v. En la selección del modelo cinético más adecuado, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, comparándolos y discriminando entre ellos considerando criterios físicos y estadísticos de una forma similar a lo hecho en el apartado 5.1.2.3. Así, los modelos propuestos son iguales a los definidos para el sistema anhidro, considerando un factor de efectividad ( $\eta$ ) de 0,11 correspondiente a la fracción de tamaño media, determinado en el apartado 5.2.1.1. Por tanto, en la Tabla 5.21 se muestran las ecuaciones de la velocidad para cada uno de los modelos propuestos.

**Tabla 5.21.** Ecuación de velocidad para los diferentes modelos cinéticos propuestos

Modelo	Ecuación cinética
4	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$
5	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
6	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$ $S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG}$ $\text{Si } C_I \geq S_{IR} \Rightarrow C_{IR} = S_{IR}$ $\text{Si } C_I < S_{IR} \Rightarrow C_{IR} = C_I$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$

### **5.2.2.3.- Selección del modelo cinético**

De igual forma a lo descrito en el apartado anterior, se ha aplicado el algoritmo de Marquardt-Levenberg y algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden para el ajuste de los modelos a los datos obtenidos. En la Tabla 5.22 se muestra los parámetros cinéticos y estadísticos para cada uno de los modelos cinéticos propuestos para el sistema con agua. Siguiendo la misma metodología en la selección y discriminación de los modelos propuestos, el primer criterio físico considerado es el rango de valores de las energías de activación ( $E_a$ ) de la constante cinética, que se muestra en la Tabla 5.22.

En este sistema con agua, la reacción directa las constantes cinéticas tienen una energía de activación entre 69,4 y 78,4 kJ mol<sup>-1</sup>; no obstante, para la reacción de hidrólisis los valores de las constantes cinéticas tiene una energía de activación para el modelo 4, 5 y 6 292,8; 157,1 y 139,9 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Como en el sistema anhidro, las constantes cinéticas del modelo 1, tienen valor de energía de activación para la reacción de hidrólisis fuera del intervalo de 2-200 kJ mol<sup>-1</sup>, considerado en los modelos cinéticos para reacciones químicas. El otro criterio aplicado fue el signo positivo en todas las constantes de adsorción o de equilibrio, que se alcanzó para todos los modelos propuestos, como puede observarse en la Tabla 5.22, los valores de las constantes son positivos para todos los modelos propuestos. En base a esto, la discriminación de los modelos 5 y 6 ha de ser realizada únicamente sobre la base de criterios estadísticos, ya que los criterios físicos se cumplen en todos ellos. El criterio estadístico considerado en primer lugar es el valor absoluto del error estándar (Tabla 5.22): éste se mantiene constante para todas las constantes y parámetros de los modelos propuestos, como sucedió con el sistema anhidro descrito anteriormente, los valores se encuentra en intervalos de confianza estrechos.

En cuanto a otros criterios estadísticos de discriminación (Tabla 5.23), el modelo 5 tiene el valor más alto de la F de Fisher, también para este modelo el valor del porcentaje de variación explicativa (VE%) es más alto, mientras que, el modelo 5 tiene el criterio de información Akaike ( $AIC_C$ ) y criterio de información bayesiano (BIC) más bajos, al igual que el SQR y RMSE.

**Tabla 5.22.** Valores físicos con error estándar para cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno para el sistema anhidro

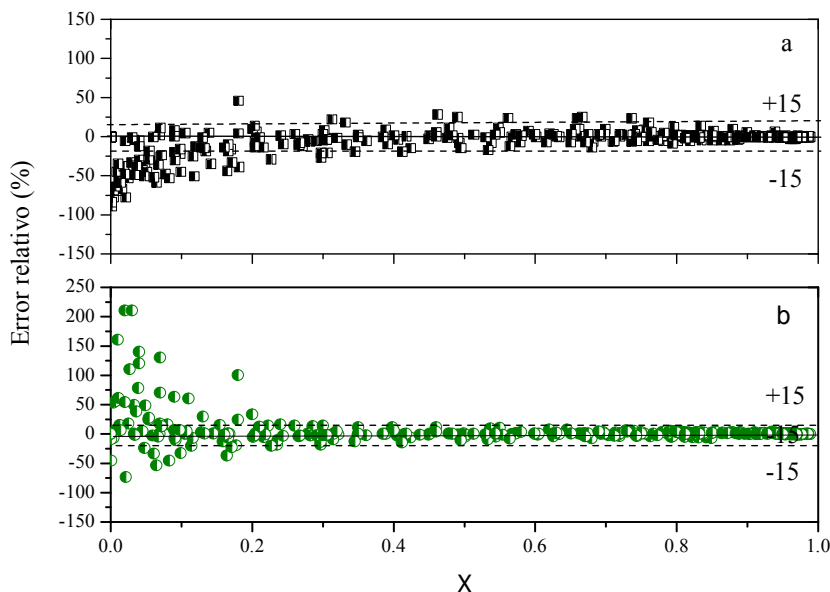
Modelo	Parámetro	Valor	Error
4	$\ln k'_{10}$	16.51	0.82
	$E_{a_{k'1}}/R$	8351	271
	$\ln k'_{20}$	93.62	7.44
	$E_{a_{k'2}}/R$	35223	2617
	$K_I$	6.42	0.85
5	$\ln k'_{10}$	19.67	0.31
	$E_{a_{k'1}}/R$	9415	102
	$\ln k'_{20}$	44.99	9.93
	$E_{a_{k'2}}/R$	18890	3430
	$\ln k_{d0}$	60.57	1.44
	$E_{a_{kd}}/R$	22415	512
	$K_I$	4.76	0.22
6	$\ln k'_{10}$	<b>17.92</b>	<b>0.25</b>
	$E_{a_{k'1}}/R$	<b>8860</b>	<b>84</b>
	$\ln k'_{20}$	<b>38.70</b>	<b>9.64</b>
	$E_{a_{k'2}}/R$	<b>16830</b>	<b>3328</b>
	$\ln k_{s0}$	<b>59.08</b>	<b>0.96</b>
	$E_{a_{ks}}/R$	<b>-1295</b>	<b>818</b>
	$\ln k_{d0}$	<b>-1.27</b>	<b>2.51</b>
	$E_{a_{kd}}/R$	<b>21927</b>	<b>340</b>
	$K_I$	<b>3.84</b>	<b>0.13</b>

**Tabla 5.23.** Valores estadísticos de cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno para el sistema anhidro

Modelo	F-Fisher	N <sub>dexp</sub>	K	SQR	AICc	BIC	RMSE	VE (%)
4	3403	363	5	3.300	-1696	-1706	0.0954	92.77
5	15667	363	7	0.470	-2400	-2414	0.0363	98.97
<b>6</b>	<b>27131</b>	<b>363</b>	<b>9</b>	<b>0.221</b>	<b>-2669</b>	<b>-2688</b>	<b>0.0253</b>	<b>99.51</b>

En la Figura 5.14 se enseña la evolución del error relativo del modelo 5 *versus* la conversión de ibuprofeno, para todos los datos de los experimentos realizados del sistema con agua. Como puede apreciarse, en el modelo 5, para un valor de conversión de menor a 0,2 se presenta en los valores negativos del error una sobrestimación con respecto a los datos experimentales, de igual manera para el modelo 6, a una conversión menor a 0,2 se presentan en algunos valores positivos y negativos del error relativo, una sobreestimación con respecto a los datos experimentales. Por encima de  $X=0,2$ , para ambos modelos (5 y

6), los valores del error relativo de los datos experimentales se encuentran dentro de la barra del error  $\pm 15\%$ .



**Figura 5.14.** Error relativo versus la conversión para:

- a) Modelo 5 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno y,
- b) Modelo 6 modelo sigmoidal pseudo-orden 1 para ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, el mejor modelo de los propuestos para el sistema con agua, es el modelo 6, el cual es un modelo sigmoidal reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y concentración de monoéster sin desactivación, siendo representado en las ecuaciones [5.17] a [5.19].

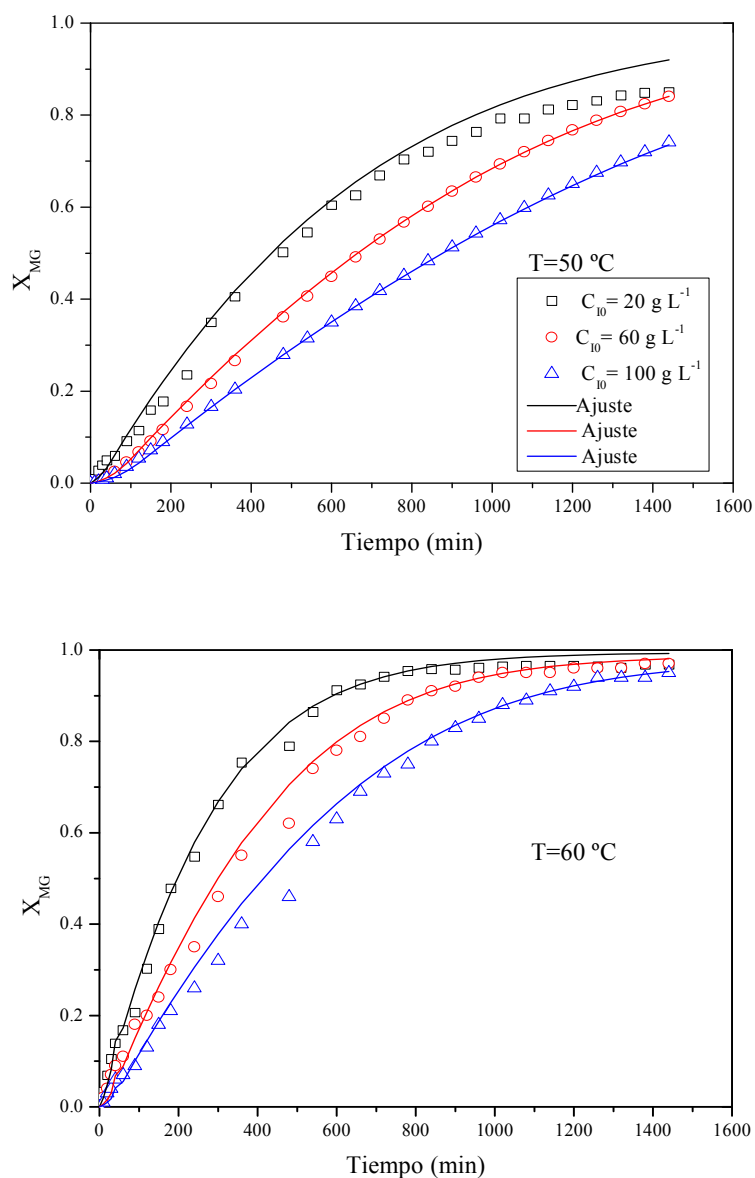
$$r = \frac{\exp\left(17,92 \pm 0,25 - \frac{8860 \pm 84}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - \exp\left(38,70 \pm 9,64 - \frac{16830 \pm 3328}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + (11,14 \pm 0,58) \cdot C_{IR}} \quad [5.17]$$

$$S_{IR} = C_{IR} + \exp\left(59,08 \pm 0,96 + \frac{1295 \pm 818}{T}\right) \cdot C_{MG} \quad [5.18]$$

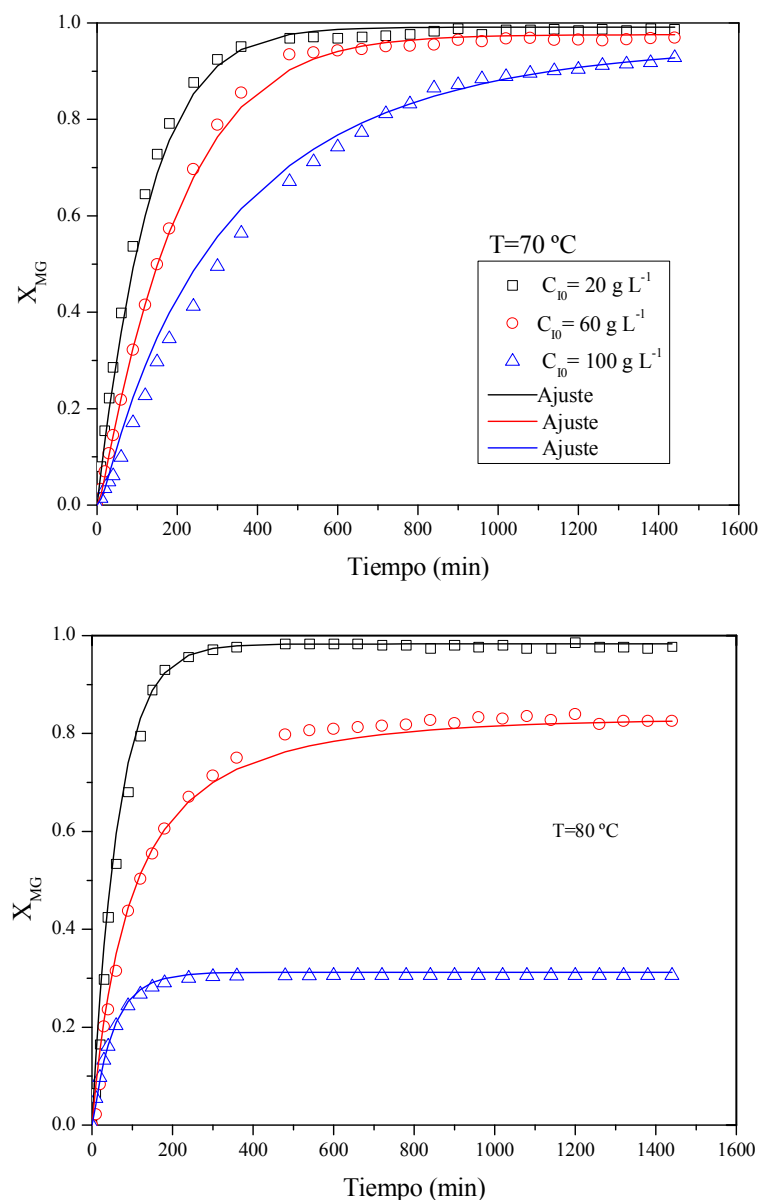
$$-\frac{da_R}{dt} = \exp\left(-1,27 \pm 0,51 - \frac{21927 \pm 340}{T}\right) \cdot a_R \cdot C_I \quad [5.19]$$

En Figuras 5.15 y 5.16 se presentan el ajuste del modelo cinético 6 a los datos experimentales obtenidos para el sistema con adición de agua a todas las concentraciones y temperaturas estudiadas. Como se puede apreciar, con el modelo propuesto, los ajustes son excelentes, aunque se observan muy pequeñas desviaciones en el intervalo de 100 a

600 min, para una concentración de ibuprofeno de  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  a una temperatura de 60 y 70 °C; de igual manera, para una concentración de ibuprofeno de  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y temperaturas de 50 y 60 °C, la bondad del ajuste es muy buena a tiempos cortos, sin embargo, a tiempos mayores de 200 min se presentan pequeñas desviaciones con respecto a los datos experimentales.



**Figura 5.15.** Ajuste del Modelo 6 sigmoidal reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno para el sistema con agua a una temperatura de 50 y 60 °C



**Figura 5.16.** Ajuste del Modelo 6 sigmoidal reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno para el sistema anhidro a una temperatura de 70 y 80 °C

A continuación se comparan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos en el modelo propuesto en la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la Novozym 435 libre de disolvente para el sistema anhidro y con adición inicial de agua. En la Tabla 5.24, como puede observarse para el modelo 6 del sistema con agua, las energías de activación ( $E_a$ ) de la reacción directa e inversa presentan un ligero aumento del 14% con respecto al sistema anhidro. La adición de agua parece tener un efecto positivo, debido a que mejora la velocidad de transferencia del ibuprofeno, como se ha

comentado anteriormente, porque la adición de agua disminuye la viscosidad de la fase glicerina. Además, la presencia de una concentración de agua de 16,7 %v/v conlleva una disminución en  $K_I$ , reduciéndose la tendencia del ibuprofeno a adsorberse en la enzima, por lo que también aumenta ligeramente la velocidad de la reacción enzimática.

Por otra parte, comparando los resultados de la esterificación de glicerina con ibuprofeno libre de disolvente catalizada por el preparado Novozym 435 con el obtenido cuando se usa la enzima libre CALB-L (Capítulo 3 de esta Memoria) se puede apreciar que los resultados son muy distintos. Por una parte, la enzima libre (Lipozyme CALB L) no está siendo sometida a desactivación, lo que se refleja en la ausencia del término de desactivación en el modelo seleccionado, y el acceso del ibuprofeno a la enzima es rápido y el aumento de la solubilidad del mismo no se refleja en el modelo cinético. No es así para la enzima inmovilizada, que presenta una fuerte desactivación química debida al ibuprofeno. En la Tabla 5.24 se puede observar que los valores de las energías de activación de la reacción directa e inversa, en la enzima Novozym 435 son más altos que con la enzima CALB-L, lo cual puede ser debido a que la enzima libre, al no tener una resistencia la transferencia del sustrato (reactivo) puede ser un poco más rápida en comparación con la lipasa inmovilizada Novozym 435. Además, de acuerdo con la literatura, las reacciones enzimáticas donde hay ausencia de limitaciones por transferencia de materia externa e interna, el intervalo de energía de activación es 40-50 KJ mol<sup>-1</sup> (Bisswanger, 2008). Así, los valores de energía de activación de CALB-L se encuentran dentro del intervalo mencionado anteriormente. Los valores de  $K_I$  son más altos con la enzima CALB-L, indicando una mayor afinidad de la enzima libre por el ibuprofeno.

**Tabla 5.24.** Parámetros cinéticos de los modelos determinados para la esterificación de glicerina con ibuprofeno sin cosolvente

Enzima	Sistema	$\ln k'_{10}$	$E_{ak1}/R$	$\ln k'_{20}$	$E_{ak2}/R$	$\ln k_{do}$	$E_{akd}/R$	$K_I$
Novozym 435	0 % v/v	15.45	7800	19.58	9562	89.13	32408	11.14
	16.7 % v/v	17.92	8860	38.70	16830	-1.27	21927	3.84
CALB-L	10 % v/v	15.37	5891	21.79	9036	-	-	30.15
	6% v/v	6.71	4612	10.40	4035	-	-	5.82

### 5.3.- REFERENCIAS CITADAS

- Ansari, S. A. y Q. Husain (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances* **30** (3): 512-523.
- Arroyo, M. (1995). Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Bisswanger, H. (2008). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, Bd. 2nd. Wiley VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Carvalho, P. d. O., F. J. Contesini y M. Ikegaki (2006). Enzymatic resolution of (R, S)-ibuprofen and (R, S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Brazilian Journal of Microbiology* **37** (3): 329-337.
- Contesini, F. J. y P. de Oliveira Carvalho (2006). Esterification of (RS)-Ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry* **17** (14): 2069-2073.
- Chen, B., M. E. Miller y R. A. Gross (2007). Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity. *Langmuir* **23** (11): 6467-6474.
- Chesterfield, D. M., P. L. Rogers, A.-Z. Essam y A. Adesoji A (2012). Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. *Chemical Engineering Journal* **207-208**: 701-710.
- Dong, H.-P., Y.-J. Wang y Y.-G. Zheng (2010). Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (S)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **66** (1-2): 90-94.
- Doran, P. M. (1995). 12 - Heterogeneous Reactions. *Bioprocess Engineering Principles*. P. M. Doran. London, Academic Press. 297-332.
- Duan, G. y C. B. Ching (1998). Preparative scale enantioseparation of flurbiprofen by lipase-catalysed reaction. *Biochemical Engineering Journal* **2** (3): 237-245.
- Duan, G., C. B. Ching, E. Lim y C. H. Ang (1997). Kinetic study of enantioselective esterification of ketoprofen with n-propanol catalysed by an lipase in an organic medium. *Biotechnology Letters* **19** (11): 1051-1055.
- Fogler, H. S. (1992). 12- Diffusion and Reaction. *Elements of chemical reaction engineering* Prentice-Hall. 815-817.
- Foresti, M. L., M. Galle, M. L. Ferreira y L. E. Briand (2009). Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase: experimental and molecular modeling aspects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **84** (10): 1461-1473.
- Foresti, M. L., M. Pedernera, V. Bucalá y M. L. Ferreira (2007). Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. *Enzyme and Microbial Technology* **41** (1-2): 62-70.
- Frampton, M. B., J. P. Séguin, D. Marquardt, T. A. Harroun y P. M. Zelisko (2013). Synthesis of polyesters containing disiloxane subunits: Structural characterization, kinetics, and an examination of the thermal tolerance of Novozym-435. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85-86** (0): 149-155.
- Gog, A., M. Roman, M. Toşa, C. Paizs y F. D. Irimie (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy* **39** (1): 10-16.
- Haigh, K. F., S. Z. Abidin, G. T. Vladisavljević y B. Saha (2013). Comparison of Novozyme 435 and Purolite D5081 as heterogeneous catalysts for the



- pretreatment of used cooking oil for biodiesel production. *Fuel* **111** (0): 186-193.
- Hari Krishna, S. y N. G. Karanth (2001). Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547** (2): 262-267.
- Hong, W. P., Jae Yeon Park, K. Min, M. Joo, K. K. Park y Y. J. Yoo (2011). Kinetics of glycerol effect on biodiesel production for optimal feeding of methanol. *Korean Journal Chemical Engineering* **28** (9): 1908-1912.
- Itabaiana Jr, I., L. S. de Mariz e Miranda y R. O. M. A. de Souza (2013). Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85-86** (1): 1-9.
- José, C., G. B. Austic, R. D. Bonetto, R. M. Burton y L. E. Briand (2013). Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel. *Catalysis Today* **213** (1): 73-80.
- José, C. y L. Briand (2010). Deactivation of Novozym 435 during the esterification of ibuprofen with ethanol: evidences of the detrimental effect of the alcohol. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* **99** (1): 17-22.
- Jun, C., B. W. Jeon, J. C. Joo, Q. A. T. Le, S.-A. Gu, S. Byun, D. H. Cho, D. Kim, B.-I. Sang y Y. H. Kim (2013). Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. *Process Biochemistry* **48** (8): 1181-1187.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-246.
- Kobayashi, T., T. Matsuo, Y. Kimura y S. Adachi (2008). Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85** (11): 1041-1044.
- Kumar, A. y R. A. Gross (2000). *Candida antarctica* Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters. *Journal of the American Chemical Society* **122** (48): 11767-11770.
- Ladero, M., A. Santos y F. Garcia-Ochoa (2007). Hindered diffusion of proteins and polymethacrylates in controlled-pore glass: An experimental approach. *Chemical engineering science* **62** (3): 666-678.
- Ladero, M., A. Santos y F. Garcia-Ochoa (2000). Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology* **27** (8): 583-592.
- Ladero, M., A. Santos y F. García-Ochoa (2001). Diffusion and chemical reaction rates with nonuniform enzyme distribution: An experimental approach. *Biotechnology and Bioengineering* **72** (4): 458-467.
- Martinsa, A., N. G. Graebina, A. S. G. Lorenzonía, R. Fernandez-Lafuentec, M. A. Z. Ayubb y R. C. Rodriguesa (2011). Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry* **46** (12): 2311-2316.
- Mears, D. E. (1971). Tests for Transport Limitations in Experimental Catalytic Reactors. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **10** (4): 541-547.
- Morrone, R., N. D'Antona, D. Lambusta y G. Nicolosi (2010). Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65** (1-4): 49-51.

- Perry, R. H. y D. W. Green (2008). Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth Edition. McGraw-Hill Professional Publishing.
- Sun, J., Y. Jiang, L. Zhou y J. Gao (2010). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New Biotechnology* **27** (1): 53-58.
- Tamayo, J. (2014). Producción enzimática de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácido benzoico y  $\alpha$ -metoxicinámico. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Tamayo, J. J., M. Ladero, V. E. Santos y F. Garcia-Ochoa (2012). Esterification of benzoic acid and glycerol to alpha-monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry* **47** (2): 243-250.
- Trubiano, G., D. Borio y A. Errazu (2007). Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 716-722.
- Wilke, C. R. y P. Chang (1955). Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE Journal* **1** (2): 264-270.
- Wolfson, A., A. Attya, C. Dlugy y D. Tavor (2010). Glycerol triacetate as solvent and acyl donor in the production of isoamyl acetate with *Candida antarctica* lipase B. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **33** (3): 363-366.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2006). Kinetic modeling of microwave-assisted chemoenzymatic epoxidation of styrene. *Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*. **52**: 1235-1247.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2008). Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48** (17): 7915-7922.
- Yadav, G. D. y I. V. Borkar (2010). Lipase-catalyzed hydrazinolysis of phenyl benzoate: Kinetic modeling approach. *Process Biochemistry* **45** (4): 586-592.

---

*Capítulo 6*  
**ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR LA ENZIMA  
NOVOZYM 435 con COSOLVENTE**

---

## **6.- ESTERIFICACIÓN de GLICERINA con IBUPROFENO UTILIZANDO la ENZIMA INMOVILIZADA NOVOZYM 435: PROCESO con COSOLVENTE**

En medio acuoso, las enzimas tienen un buen comportamiento puesto de manifiesto durante décadas. Más reciente es su utilización en fase orgánica; durante años se ha estudiado el comportamiento de las enzimas en presencia de un medio orgánico. Klivanov (2001) demostró que las enzimas mantenían su actividad cuando se encontraban en medio orgánico, al menos en ciertas condiciones. Las enzimas en presencia de un cosolvente (medio orgánico) tienen, en general, las siguientes ventajas (Gonzalo, 2003; Idris y col., 2012):

- a) Aumento de la estabilidad térmica, apreciable con bajos contenido de agua.
- b) Aumento de la solubilidad de sustratos hidrofóbicos.
- c) Ausencia de reacciones laterales que pueden ocurrir en medio acuoso con el consiguiente cambio en la selectividad y especificidad de las enzimas.

Dependiendo de la naturaleza del disolvente, las enzimas pueden ser menos activas y estables. Se suele utilizar el coeficiente de partición octanol/agua ( $\log P$ ) como una medida de la polaridad de los disolventes. Se suele aceptar que la actividad enzimática en un medio orgánico es baja si el disolvente tiene un  $\log P < 2$ , moderada si  $2 < \log P < 4$ , y alta si el  $\log P > 4$  (Faber, 2011). De esta manera, en el Capítulo 4 de esta Memoria, se probó una serie de disolventes (butanona, xileno, dioxano, ter-butil alcohol, tolueno) en la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB-L en su forma libre; de dicho estudio se seleccionó el tolueno ( $\log P = 2.5$ ) como cosolvente, por ser el disolvente que presentaba una solubilidad notable de ibuprofeno. Otros autores han usado este cosolvente, en la esterificación enzimática del flurbiprofeno (Morrone y col., 1995) y naproxeno (Morrone y col., 2010) con propanol en presencia de tolueno y usando el preparado enzimático Novozym 435, se ha alcanzado una conversión del 34% y 20%, respectivamente.

En un medio orgánico el contenido de agua es fundamental, debido a que las enzimas tienen que tener una hidratación mínima, para mantener su conformación activa y, de esta manera, no perder su actividad y estabilidad catalítica. Por lo tanto, una cierta cantidad de agua tiene que estar presente en el medio de reacción, para que la enzima pueda mantener su estructura (Klibanov, 2001). Lue y col. (2015) han estudiado la

influencia de la presencia de agua en la esterificación enzimática de ácido cinámico con octadecanol catalizada por Novozym 435, utilizando como disolvente una mezcla de isooctano/2-butanona; en este sistema, con bajo contenido en agua, la actividad enzimática es alta, alcanzando un valor de  $198 \text{ mmol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  y un rendimiento del éster de un 80%. Además, la adición de agua al medio también puede tener efectos positivos sobre la estabilidad de la enzima (Kobayashi y col., 2008).

En el Capítulo 5 se ha estudiado la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la Novozym 435 en un medio libre de disolvente. Se observó que las limitaciones del transporte de materia interno son significativas en los sistemas estudiados (anhidro y con agua). Operar en condiciones de control difusional significa no utilizar todo el potencial de la enzima inmovilizada, aunque puede tener como efecto positivo disminuir el posible efecto de la desactivación enzimática. Favorecer la transferencia de materia en el interior de los poros conlleva una mejora en la eficacia y, por lo tanto, menor cantidad de enzima para alcanzar una determinada conversión. Existen varios medios para aumentar la velocidad de la difusión interna, entre ellos: uso de aditivos (Lu y col., 2007; Painmanakul y col., 2005); ultrasonidos (Hasan y col., 2013); campos eléctricos (Porrás-Parral y col., 2011; Reay y col., 2013; Reay, 2013); presencia de reacciones y fenómenos acoplados a la propia transferencia de materia (Biard y col., 2013; Jeon y col., 2011; Ruthiya y col., 2003) y cambios de presión (Thomas y col., 2002).

Así, la presencia de una cierta concentración de agua en el medio de reacción podría mejorar la transferencia de materia en los poros del biocatalizador debido a la disminución de la viscosidad por la acumulación o adición de agua (Cheng, 2008). De esta manera, en el estudio de la esterificación enzimática de ácido benzoico con glicerina catalizada por la Novozym 435 sin cosolvente, se ha comprobado que la adición de agua al medio de reacción es una estrategia exitosa como vía para reducir los problemas difusionales en el sistema, al trabajar con un disolvente muy viscoso (glicerina) y un biocatalizador heterogéneo (Tamayo, 2014).

Ahora bien, la inmovilización de la enzima puede llevar consigo limitaciones de transferencia de materia externos e internos, debido al tamaño de las moléculas de enzima y la naturaleza del soporte, se podría restringir la difusión del sustrato hacia el centro activo de la enzima (Ladero y col., 2007). Por otra parte, el soporte de la enzima inmovilizada podría hincharse en presencia de un disolvente (“swelling”), provocando

un incremento en la actividad catalítica del biocatalizador. Otro posible efecto es la mejora de la estabilidad térmica, porque, en presencia de un disolvente, la estructura conformacional de la enzima puede ser un poco rígida (Wong, 1989).

A continuación, se aborda el estudio del proceso de esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizado por la enzima CALB en su forma inmovilizada (Novozym 435) en presencia de un cosolvente. En este estudio, se considera el mismo disolvente seleccionado en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno usando la enzima libre CALB-L, que fue el tolueno (Capítulo 4). Ahora bien, este es un sistema que se caracteriza por tener a la enzima lipasa inmovilizada, por tanto, es un sistema trifásico ( $L_1$ - $L_2$ -S), donde  $L_1$  está formada por el ibuprofeno disuelto en tolueno,  $L_2$  es la fase glicerina, mientras S es la fase sólida constituida por la enzima está inmovilizada. Al igual que en el apartado anterior se han planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar las condiciones de operación adecuadas para llevar a cabo la reacción de esterificación de glicerina e ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 en un medio de reacción con disolvente.
2. Proponer un modelo cinético que permita describir los resultados obtenidos. Para ello, después de formular diversos modelos, se procederá a seleccionar el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos utilizando los criterios físicos y estadísticos habituales.

## **6.1.- ESTUDIO del SISTEMA ANHIDRO**

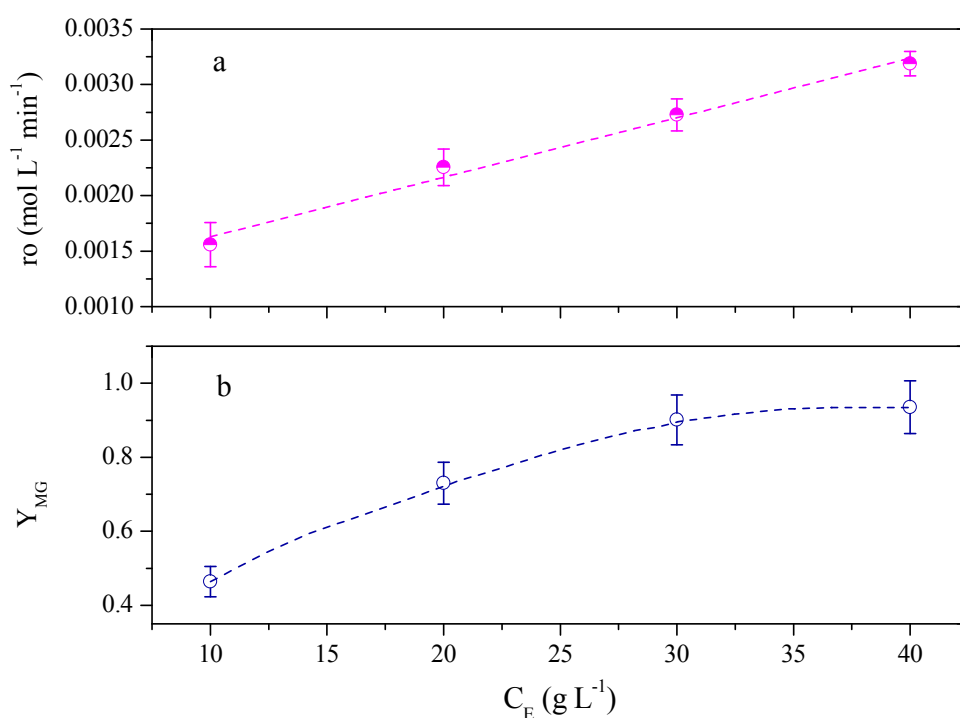
### **6.1.1.- Experimentos previos**

Para dar cumplimiento al primer objetivo, se realizaron una serie de experimentos previos, analizando el efecto de las siguientes variables en la reacción de esterificación:

- Efecto de la concentración de enzima.
- Efecto de la velocidad de agitación.
- Efecto de tamaño de partícula del biocatalizador.
- Efecto de la temperatura y concentración inicial de ibuprofeno.
- Efecto de la concentración de agua.

### 6.1.1.1.- Efecto de la concentración de enzima

En la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435 en presencia de un cosolvente (tolueno), se estudió el efecto de la concentración de enzima entre 10 y 40  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En la Figura 6.1a se muestra la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima empleada. Se puede observar que la velocidad inicial de esterificación aumenta con la concentración de enzima. Sin embargo, como se presenta en la Figura 6.1b, al incrementar la concentración de enzima el rendimiento a monoéster aumenta pero se mantiene sin apenas cambios a partir de una concentración de enzima de 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esto puede ser debido a que, a altas concentraciones de enzima, hay más sitios activos para el anclaje del sustrato con la enzima (complejo acil-enzima) y, por ende, aumenta la velocidad de la reacción.

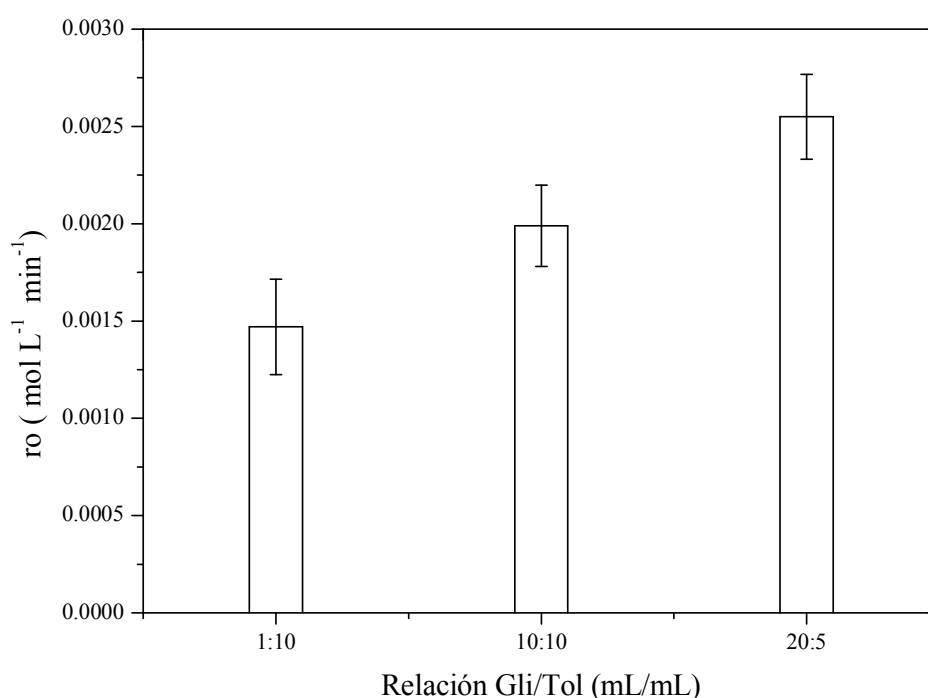


**Figura 6.1.** a) Velocidad inicial y b) Rendimiento final de esterificación de glicerina con ibuprofeno frente a la concentración de enzima Novozym 435

Condiciones:  $C_{I0}=60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=70^\circ\text{C}$ ;  $N=720\text{ rpm}$ ;  $C_w=0\text{ \%v/v}$  y  $\text{Gli/Tol}=20/5$

### 6.1.1.2.- Estudio de la relación glicerina-tolueno

La influencia de la relación glicerina-tolueno (Gli/Tol) en la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435, se analizó usando las mismas relaciones Gli/Tol consideradas en el sistema con la enzima libre CALB-L descrito en el apartado 4.1.4 de esta Memoria; se cambió dicha relación Gli/Tol tomando los siguientes valores: 1/20; 10/10 y 20/5. Como se puede observar en la Figura 6.2, para una relación de Gli/Tol=1/20 la velocidad inicial de esterificación es baja, pero se incrementa a medida que aumenta la relación entre la glicerina y el tolueno. Este comportamiento es muy similar al observado cuando en el medio está presente la enzima libre CALB-L; en consecuencia, la relación Gli/Tol= 20/5 fue la elegida para la realización de la experimentación posterior. Además, los valores de la velocidad inicial de esterificación son más altos cuando está presente en el medio el preparado Novozym 435 que con la enzima libre CALB-L, lo cual puede ser debido a que las concentraciones de compuestos en torno a la enzima son más adecuadas para su actividad o, alternativamente, a que la concentración efectiva de enzima es mayor sobre una superficie sólida que la distribuye adecuadamente, la de la resina VPOC 1600 de Lanxess que se utiliza en el preparado Novozym 435.



**Figura 6.2.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno a diferentes relaciones de glicerina-tolueno.  
Condiciones:  $C_{10}=100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80^{\circ}\text{C}$ ;  $N=720\text{ rpm}$  y  $C_w=0\text{ \%v/v}$

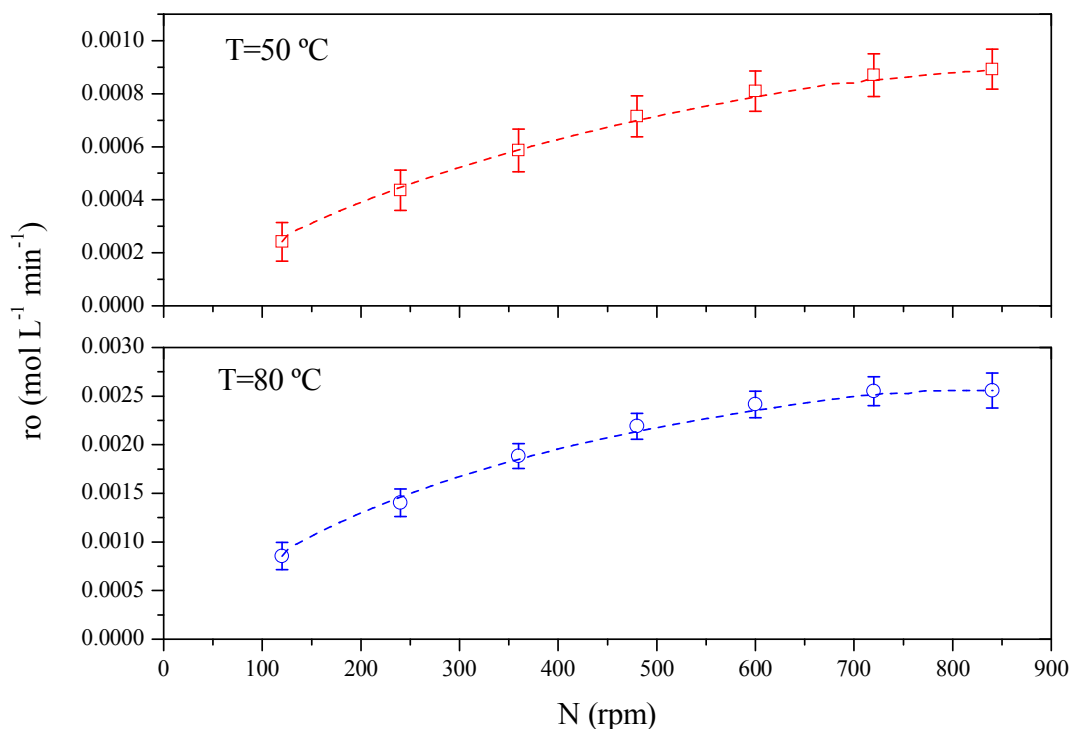


### **6.1.1.3.- Estudio de la transferencia de materia**

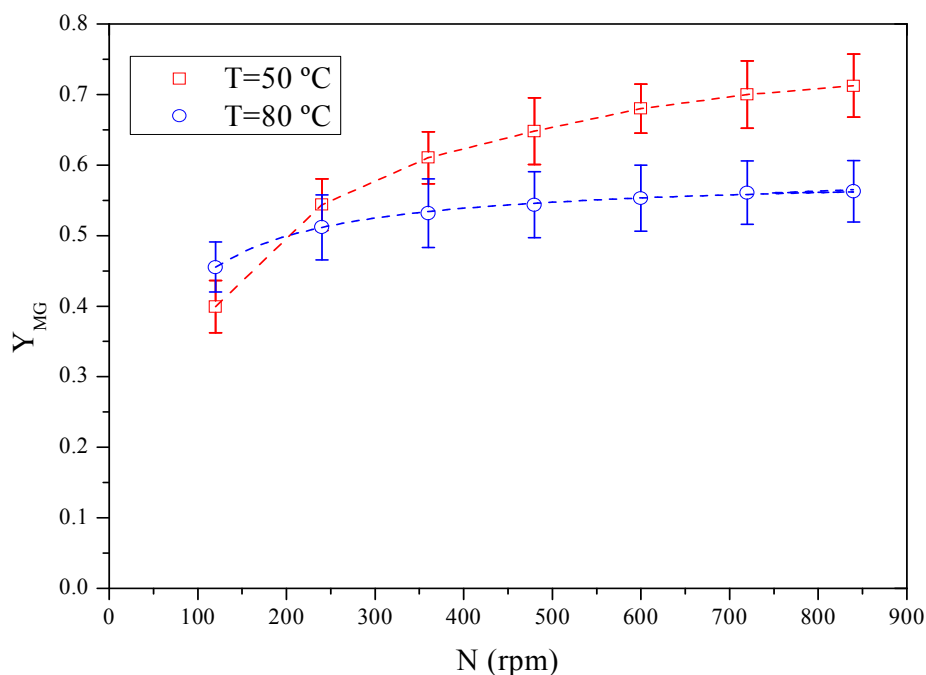
Para comprobar la existencia de posibles limitaciones por la resistencia al transporte de materia, se trabajó de una forma similar a lo descrito en el capítulo 5 de esta Memoria. Se estudió el efecto de la velocidad de agitación y del tamaño de partícula del biocatalizador y, de esta manera, determinar los posibles problemas difusionales en la película externa y en el interior de la matriz porosa del biocatalizador.

#### ***Transferencia de Materia Externa***

La influencia de la velocidad de agitación se estudió a dos temperaturas: 50 y 80 °C, variando la velocidad de agitación entre 120 y 840 rpm. Como puede observarse en la Figura 6.3, a las temperaturas consideradas la velocidad inicial de esterificación aumenta con el aumento de la velocidad agitación. A baja velocidad de agitación, el contacto entre las fases es deficiente, debido a que el tolueno es inmiscible en la glicerina, el medio de reacción, pero el contacto aumenta al aumentar la velocidad de agitación. También se puede observar que la velocidad inicial de esterificación presenta valores más bajos a una temperatura de 50 °C que a 80 °C; este comportamiento es lógico y muy parecido al observado en el capítulo 5 de esta Memoria: a baja temperatura ( $T=50$  °C) la viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno es alta pero su valor disminuye considerablemente al aumentar la temperatura hasta 80 °C. Además, se puede apreciar que a 80 °C, para un valor de la agitación de 600-840 rpm, no hay cambios significativos en la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno; a 50 °C puede considerarse que no existen cambios en la velocidad inicial por encima de 720 rpm. En la Figura 6.4, puede apreciarse que a 50 °C un incremento de la velocidad de agitación hasta 600 rpm produce un aumento en el rendimiento final del monoéster de ibuprofeno (MG); sin embargo, con un incremento adicional de la velocidad de agitación de 720 hasta 840 rpm, el rendimiento final del monoéster (MG) no presenta cambios significativos, al menos por encima del error experimental estimado. A 80 °C, por encima de 480 rpm, un incremento en la velocidad de agitación no conlleva a cambios notables en el rendimiento final del monoéster. Por tanto, se puede afirmar que las posibles limitaciones del transporte de materia externas no son significativas a partir de 720 rpm y la cantidad del monoéster de ibuprofeno (MG) formado es independiente de la velocidad de agitación a partir de dicho valor.



**Figura 6.3.** Efecto de la velocidad de agitación en la velocidad inicial de esterificación. Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=50$  y  $80^\circ\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g L}^{-1}$ ;  $C_w=0 \text{ \% v/v}$ ; Gli/Tol=20/5



**Figura 6.4.** Efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento final de monoéster de ibuprofeno. Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=50$  y  $80^\circ\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g L}^{-1}$ ;  $C_w=0 \text{ \% v/v}$ ; Gli/Tol=20/5

Para corroborar estos resultados, se ha aplicado el módulo de Mears definido por la ecuación [5.1]; la difusividad molecular ( $D_{ij}$ ) se ha calculado utilizando la ecuación

[5.6]. Para este sistema, se ha determinado experimentalmente la viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno usando un viscosímetro de cilindros concéntricos; el procedimiento de medida está descrito en el capítulo 2 de esta Memoria. En la Tabla 6.1 se muestran los valores de la viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno ( $\mu_m$ ) y la difusividad molecular ( $D_{ij}$ ). Se puede observar que la viscosidad de la mezcla disminuye notablemente al aumentar la temperatura y, por ende, los valores de difusividad molecular aumentan con el incremento de la temperatura.

El criterio de Mears establece que, si  $Me < 0,15$ , se pueden despreciar las limitaciones de la transferencia de materia externa. Como se puede observar en la Tabla 5.2, para una concentración inicial de ibuprofeno de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , los valores de velocidad de transferencia de materia ( $k_L \cdot a \cdot C_{I0}$ ) son muchos mayores que la velocidad inicial de esterificación, y el valor de Mears significativamente menor a 0,15, por tanto, las limitaciones por transferencia externa no son significativas en las citadas condiciones. De esta manera, para garantizar que las fases presentes en el medio de reacción tengan un buen contacto, se elige 720 rpm como velocidad de agitación para la realización de la experimentación posterior.

**Tabla 6.1.** Valores de la difusividad molecular y de la viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno estimadas en el intervalo de temperatura de operación

T(°C)	$D_{ij} \times 10^{11} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$	$\mu_m \text{ (kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$
50	4.50	0.053
60	8.24	0.030
70	14.8	0.017
80	21.5	0.012

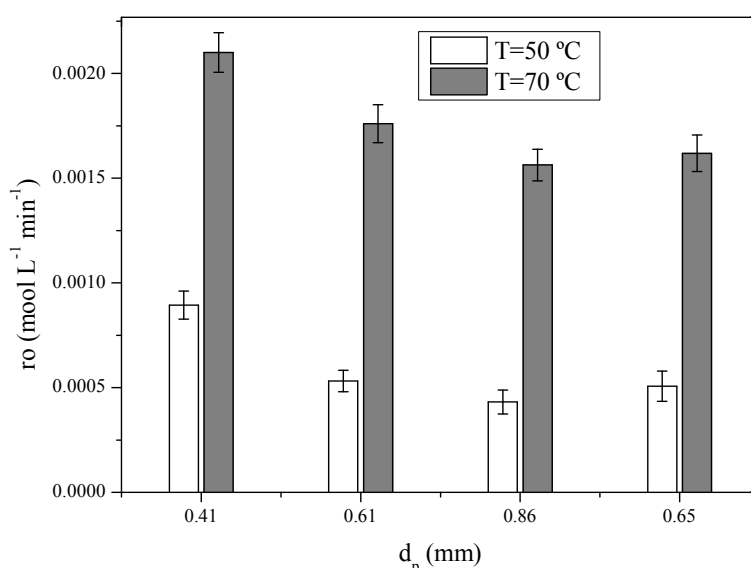
**Tabla 6.2.** Valores del módulo de Mears y de magnitudes necesarias para su cálculo a distintas temperaturas y velocidades de agitación

T (°C)	N (rpm)	$r_{obs} \times 10^4 \text{ (mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	$k_L \cdot a \cdot C_{I0} \text{ (mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}\text{)}$	Me $\times 10^4$
50	600	7.79	2.01	1.94
	720	8.76	2.20	1.99
	840	9.08	2.38	1.91
80	600	23.9	7.36	1.62
	720	25.5	8.06	1.58
	840	25.6	8.70	1.47

### Transferencia de Materia Interna

Para estudiar el efecto de la transferencia de materia en los poros, se operó de una forma similar al capítulo anterior, cambiando el tamaño de partícula del biocatalizador empleado. Se midió experimentalmente la velocidad del proceso a dos temperatura: 50 y 70 °C, utilizando las mismas fracciones de tamaño de partícula consideradas en el sistema descrito en el capítulo 5, siendo dichos tamaños de partícula los siguientes: 0,32-0,5; 0,5-0,7 y 0,7-1 mm.

En la Figura 6.5 se muestra la velocidad inicial de esterificación frente a distintos valores del diámetro medio de partícula ( $d_p$ ). Se puede observar que a medida que aumenta el tamaño de partícula disminuye significativamente la velocidad inicial de esterificación; por tanto, deben existir problemas de difusión en el interior de la partícula del biocatalizador. Este comportamiento es casi idéntico al que se observó en el sistema sin tolueno como disolvente; sin embargo, en este sistema la velocidad inicial de esterificación es de un orden de magnitud mayor con respecto a los valores de velocidad inicial alcanzados en el sistema sin la presencia de disolvente (tolueno). Esta mejora en la velocidad inicial de esterificación es debida a que con la presencia de disolvente en el medio de reacción mejora la solubilidad del ibuprofeno, y por ende, se mejora la transferencia del sustrato hacia el centro activo de la enzima.



**Figura 6.5.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno *versus* distintos tamaños medios de partículas de Novozym 435.

Condiciones:  $C_{I0}=60$  g·L<sup>-1</sup>; T=50 y 70 °C;  $C_E=30$  g L<sup>-1</sup>; N=720 rpm;  $C_w=0$  % v/v y Gli/Tol=20/5

Para comprobar la posible existencia de limitaciones por difusión interna, se determinó el factor de efectividad ( $\eta$ ) por el mismo procedimiento considerado en el capítulo 5, planteando un sistema con las ecuaciones [5.8] y [5.9]. En la Tabla 6.3 se muestran los valores del factor de efectividad para cada uno de los tamaños de partícula empleados a las dos temperaturas especificadas. Como se puede apreciar, los valores del factor de efectividad calculados son menores a la unidad ( $\eta < 1$ ) variando entre 0,12 y 0,25, además, un incremento en la temperatura provoca una ligera disminución en el factor de efectividad. Como en el capítulo anterior, los valores medios del factor de efectividad se encuentran muy cercanos al valor para el tamaño de partícula de 0,5 y 0,7 mm. Por otra parte, la presencia de una cierta cantidad de tolueno en el medio de reacción conlleva un ligero incremento en los valores del factor de efectividad en comparación con el sistema libre de disolvente y en ausencia de agua (Tabla 5.3).

Como comprobación, se calculó el valor del módulo de Weisz-Prater ( $We-Pt$ ) usando la ecuación [5.12], y el valor del coeficiente de difusión efectivo ( $D_e$ ) por la ecuación [5.13]. Para este sistema, se ha considerado que la porosidad de partícula es 0,5, la tortuosidad es 13 y el factor de constricción de 0,4; valores ligeramente distintos que en el capítulo anterior aunque se trata del mismo sólido poroso. Es conocido que el preparado Novozym 435 tiende a hincharse cuando está presente en medio orgánico, por tanto, la relación  $\sigma/\tau$  tiene un valor distinto al establecido en el estudio realizado en el capítulo 5. Poojari y col. (2013) han determinado el grado de hinchamiento (“swelling”) de Novozym 435 en presencia de los siguientes disolventes: tolueno, difenil éter e isooctano; en este estudio fue observado que la resina acrílica del soporte muestra un hinchamiento considerable con los tres disolventes empleados, que no presenta en su contacto con glicerina. Además, concluyen que el grado de hinchamiento depende del tipo de solvente, de la temperatura y del periodo de contacto (Poojari y col., 2013).

En la Tabla 6.3 se presentan los valores del módulo de Weisz-Prater y del coeficiente de difusión efectivo. Como se puede observar, los valores del módulo de Weisz-Prater son mayores a 3, aunque disminuyen ligeramente con el aumento de la temperatura. En cuanto a los valores del coeficiente de difusión efectivo, aumentan significativamente con la temperatura, debido a la notable disminución de la viscosidad a temperaturas más altas; esto lleva consigo que la velocidad de transporte aumente casi lo mismo que la velocidad de reacción y, por tanto, el factor de efectividad sea muy

parecido a diferentes temperaturas. La presencia de tolueno, y la disminución de la viscosidad de la glicerina por temperatura, conlleva que los valores del módulo de We-Pt en este sistema disminuyan considerable en comparación con el sistema en ausencia de cosolvente, estudiado en el capítulo 5 de esta Memoria (Tabla 5.3). De esta manera, los valores del módulo We-Pt  $>3$ , sugieren que las limitaciones por transferencia de materia son significantes y, por tanto, debe ser considerada esta circunstancia en el modelo cinético.

**Tabla 6.3.** Valores del coeficiente difusivo efectivo, factor de efectividad y módulo de We-Pt distintas temperaturas

T (°C)	$D_{ij} \times 10^{11}$ ( $m^2 s^{-1}$ )	$D_e \times 10^{13}$ ( $m^2 s^{-1}$ )	Fracción % w/w	Tamaño partícula (mm)	$r_{obs} \times 10^4$ Novozym 435 ( $mol L^{-1} min^{-1}$ )	$\eta$	We-Pt
50	4.50	6.75	13	0.32-0.5	11.6	0.23	4.0
			52	0.5-0.7	6.92	0.15	5.4
			35	0.7-1	5.65	0.12	8.0
			Media	0.3-1	6.60	0.14	4.5
70	14.8	22.2	13	0.32-0.5	21.0	0.18	2.3
			52	0.5-0.7	17.6	0.15	4.2
			35	0.7-1	15.6	0.13	7.5
			Media	0.3-1	16.2	0.14	4.4

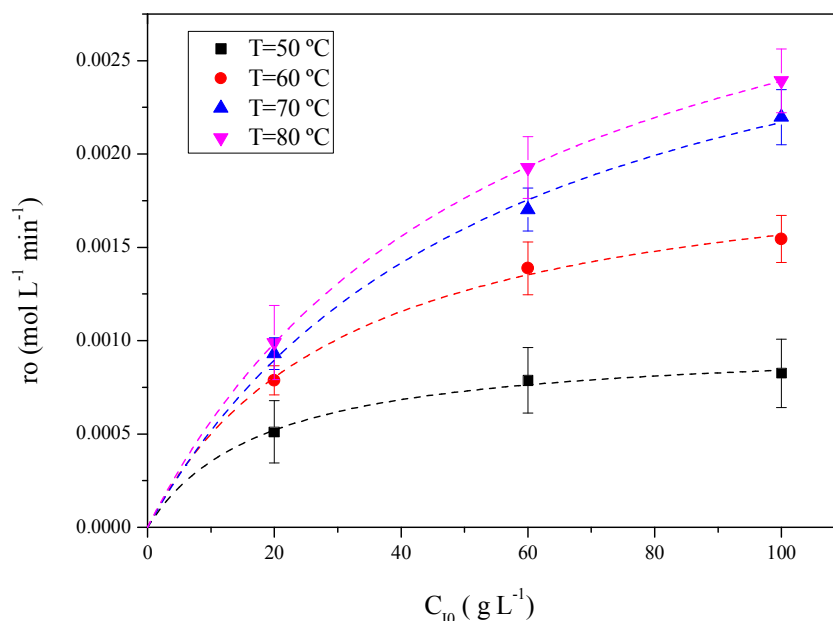
#### 6.1.1.4.- Estudio de los efectos de inhibición y de desactivación

Como se mencionó en los capítulos 3 y 4, al llevar a cabo la esterificación enzimática, la actividad de la enzima puede estar afectada por la presencia de inhibidores, ya sean productos o reactivos de esta reacción. Debido a esto, se ha realizado un estudio semejante al descrito en los capítulos anteriores: se observa el efecto de las concentraciones de ibuprofeno y de agua y de la temperatura en la velocidad de esterificación de glicerina con ibuprofeno usando la enzima Novozym 435.

##### *Efecto de la concentración inicial de ibuprofeno y de la temperatura*

El posible efecto inhibidor del reactivo (ibuprofeno) en la esterificación enzimática del ibuprofeno con la glicerina se estudió variando la concentración inicial de ibuprofeno entre 20 a 100  $g \cdot L^{-1}$ , y la posible desactivación de la enzima se analizó modificando la temperatura entre 50 y 80 °C con una concentración constante del preparado enzimático Novozym 435 (30  $g \cdot L^{-1}$ ) y una relación fija Gli/Tol de 20/5.

En la Figura 6.6, se muestra la velocidad inicial de esterificación para cada una de las concentraciones de ibuprofeno y las distintas temperaturas de operación. Como se puede observar, para cualquier temperatura considerada, la velocidad inicial de la esterificación aumenta con la concentración inicial de ibuprofeno de forma hiperbólica, siguiendo la tendencia típica de acuerdo a un modelo de Michaelis y Menten, como sucede en los sistemas que emplean la enzima en su forma libre (CALB-L) en ausencia y presencia de un cosolvente (Capítulos 3 y 4). No obstante, se pudo apreciar una desactivación a tiempos de reacción elevados, a una temperatura de 80 °C y a la mayor concentración de ibuprofeno ( $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), siendo el rendimiento final a monoéster de ibuprofeno de un 0,56 (Figura 6.5). Por tanto, como sucedió en el sistema anhidro empleando la enzima Novozym 435 en un medio libre de disolvente, el ibuprofeno actúa como agente desactivante. Sin embargo, se observa que, en el sistema sin cosolvente, hay una mayor desactivación del preparado Novozym 435 comparado con el sistema donde hay presencia de este: el valor de rendimiento de monoéster de ibuprofeno obtenido para una concentración inicial de ibuprofeno de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y una temperatura de 80 °C fue de 0,12 (ver Tabla 5.10), siendo éste un rendimiento mucho menor que en el sistema con una cierta cantidad de tolueno (0,56). Esta mejora en el rendimiento del producto puede ser debida a que la presencia del tolueno tiene el efecto del hinchamiento antes comentado, al estar el preparado enzimático Novozym 435 en contacto con el disolvente, lo que también permite el transporte directo de ibuprofeno en concentración elevada hacia el interior del biocatalizador. En este sentido, la desactivación de la enzima en este sistema puede ser considerada debida a una sinergia entre la concentración de ibuprofeno y la temperatura, como ya sucedió en otros sistemas (Tamayo y col., 2012) y, por lo tanto, hay que tomarlo en cuenta en el planteamiento del modelo cinético.



**Figura 6.6.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina e ibuprofeno frente a la concentración inicial de ibuprofeno.

### *Efecto de la concentración de agua*

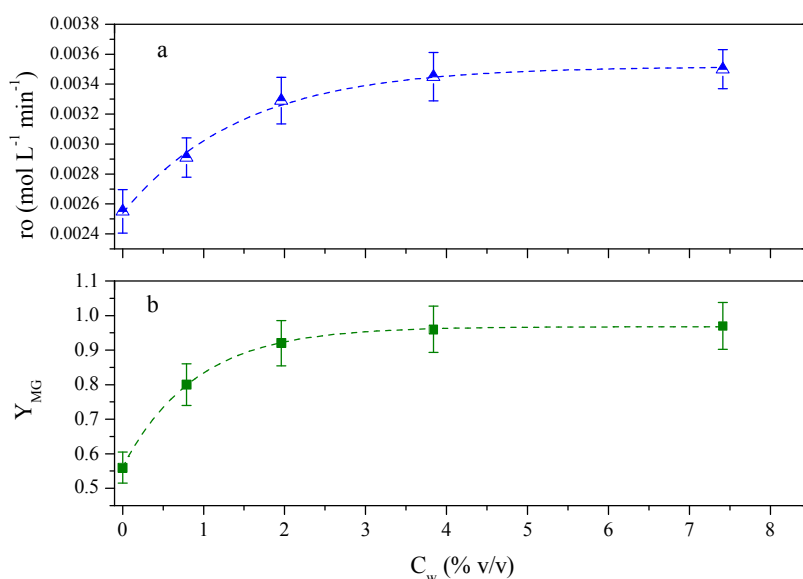
Como ya se comentó en capítulos anteriores, cuando la enzima se encuentra en un medio orgánico, el contenido de agua es importante para su actividad y estabilidad catalítica, un cierto contenido de agua debe existir para que la enzima pueda mantener su estructura (Klibanov, 2001). Por esta razón, la inhibición por agua, un producto de la esterificación de glicerina e ibuprofeno, se ha estudiado considerando el mismo intervalo de concentración usado en el sistema con la enzima CALB-L en su forma libre (Capítulo 4 de esta Memoria). Así, el intervalo de concentración de agua se varió de 0 a 7,4 %v/v, empleando en estos experimentos una velocidad de agitación de 720 rpm, una temperatura fija de 80 °C y una concentración inicial de ibuprofeno de 100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , con una concentración de enzima 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En la Figura 6.7a se puede observar que la velocidad inicial de esterificación aumenta hasta un valor de concentración de agua del 2 % v/v, mientras que no se observan cambios significativos por encima de este valor. Considerando el rendimiento final a monoéster de ibuprofeno, en la Figura 6.7b se puede apreciar un comportamiento muy similar al de la velocidad inicial de esterificación. En la literatura, se ha estudiado el efecto de la presencia de agua usando el preparado Novozym 435 en un medio orgánico; en la esterificación enzimática del ácido cinámico con octadecanol catalizada



por la Novozym 435 en un medio orgánico se concluyó que dicho preparado enzimático requiere de una cierta cantidad de agua para mantener su conformación activa (Lue y col., 2005). No obstante, la adición de gran cantidad agua podría facilitar la hidrólisis del éster, por ser la esterificación una reacción reversible. Como en casos anteriores, la glicerina por ser altamente higroscópica y estar en gran exceso, mitiga la reacción inversa (hidrólisis). Además, como se ha considerado en el estudio de los sistemas anteriores, la presencia agua disminuye la viscosidad de la glicerina en el medio de reacción y, por tanto, se favorece la transferencia del sustrato y producto hacia y desde el centro activo de la lipasa.

En la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado enzimático Novozym 435 en ausencia de disolvente, se ha estudiado el efecto de la concentración de agua, observando un incremento en el rendimiento final a monoéster de ibuprofeno de 0,12 a 0,30 cuando se aumenta dicha concentración de agua, alcanzando el valor más alto a una concentración de agua 16,7 %v/v; además, se observó que hay una desactivación de la enzima. De esta manera, bajo las condiciones de operación estudiadas: una relación Gli/Tol=20/5 y una concentración de agua 2 a 7,4 % v/v, se puede obtener una mejora en el rendimiento final de monoéster, alcanzando un valor de 0,96 en las mejores condiciones (Figura 6.7 b); además, se evita así la desactivación de la enzima, como se verá más adelante.



**Figura 6.7.** Efecto de la concentración de agua en: a) Velocidad inicial y b) Rendimiento final de monoéster de ibuprofeno.

Condiciones de operación:  $C_{I0}=100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T=80^\circ\text{C}$ ;  $N=720$  rpm y  $C_w=0$  %v/v y Gli/Tol=20/5

### **6.1.2.- Determinación del modelo cinético**

En este apartado, se hace la propuesta de modelos cinéticos y la selección del modelo que mejor describe los datos experimentales obtenidos, de esta manera se da cumplimiento al objetivo 2 al comienzo de este capítulo.

#### **6.1.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos**

En la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 con tolueno como cosolvente, de acuerdo con los experimentos previos, las condiciones de operación elegidas para el estudio cinético han sido las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, concentración de enzima de 30 g·L<sup>-1</sup>, velocidad de agitación de 720 rpm y sin adición de agua (concentración de agua de 0 %v/v). En la Tabla 6.4 se muestran los experimentos realizados para el sistema anhidro en presencia de cosolvente (tolueno). Mientras que se muestran los datos experimentales obtenidos en estas condiciones en las Tablas 6.5 a 6.8.

**Tabla 6.4.** Experimentos realizados para el sistema anhidro con enzima inmovilizada (Novozym 435) y con cosolvente

<b>Experimento</b>	<b>C<sub>w</sub> (% v/v)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>C<sub>10</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>
S4E1	0	50	20
S4E2	0	50	60
S4E3	0	50	100
S4E4	0	60	20
S4E5	0	60	60
S4E6	0	60	100
S4E7	0	70	20
S4E8	0	70	60
S4E9	0	70	100
S4E10	0	80	20
S4E11	0	80	60
S4E12	0	80	100

**Tabla 6.5.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=50 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S4E1 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S4E2 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C		S4E3 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=50 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.080	0.008	0.030	0.009	0.020	0.010
20	0.140	0.013	0.050	0.014	0.030	0.014
30	0.190	0.018	0.080	0.023	0.050	0.024
40	0.231	0.022	0.110	0.032	0.070	0.034
60	0.312	0.030	0.160	0.046	0.090	0.043
90	0.412	0.040	0.220	0.063	0.150	0.072
120	0.489	0.047	0.270	0.078	0.190	0.091
150	0.531	0.051	0.320	0.092	0.240	0.115
180	0.584	0.056	0.380	0.109	0.270	0.130
240	0.662	0.064	0.450	0.130	0.320	0.154
300	0.741	0.071	0.520	0.150	0.380	0.182
360	0.775	0.074	0.560	0.161	0.410	0.197
400	0.794	0.076	0.590	0.170	0.430	0.206
500	0.845	0.081	0.620	0.179	0.470	0.226
600	0.874	0.084	0.660	0.190	0.510	0.245
700	0.889	0.085	0.690	0.199	0.550	0.264
800	0.905	0.087	0.720	0.207	0.580	0.278
900	0.924	0.089	0.740	0.213	0.610	0.293
1000	0.931	0.089	0.750	0.216	0.630	0.302
1100	0.934	0.090	0.770	0.222	0.650	0.312
1200	0.934	0.090	0.790	0.228	0.680	0.326
1300	0.938	0.090	0.810	0.233	0.700	0.336
1400	0.941	0.090	0.820	0.236	0.720	0.346
1500	0.942	0.090	0.830	0.239	0.735	0.353

**Tabla 6.6.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=60 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S4E4 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C		S4E5 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C		S4E6 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=60 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.110	0.011	0.048	0.014	0.035	0.017
20	0.183	0.018	0.099	0.029	0.061	0.029
30	0.257	0.025	0.153	0.044	0.099	0.048
40	0.301	0.029	0.205	0.059	0.125	0.060
60	0.401	0.039	0.280	0.081	0.179	0.086
90	0.502	0.048	0.378	0.109	0.231	0.111
120	0.584	0.056	0.455	0.131	0.290	0.139
150	0.651	0.063	0.491	0.141	0.336	0.161
180	0.704	0.068	0.532	0.153	0.367	0.176
240	0.754	0.072	0.591	0.170	0.410	0.197
300	0.808	0.078	0.631	0.182	0.445	0.214
360	0.841	0.081	0.671	0.193	0.503	0.242
400	0.867	0.083	0.692	0.199	0.530	0.254
500	0.912	0.088	0.735	0.212	0.586	0.281
600	0.927	0.089	0.766	0.221	0.630	0.302
700	0.934	0.090	0.790	0.228	0.665	0.319
800	0.941	0.090	0.809	0.233	0.695	0.334
900	0.943	0.091	0.825	0.238	0.720	0.346
1000	0.948	0.091	0.838	0.241	0.741	0.356
1100	0.951	0.091	0.848	0.244	0.759	0.364
1200	0.952	0.091	0.858	0.247	0.775	0.372
1300	0.953	0.092	0.866	0.249	0.789	0.379
1400	0.954	0.092	0.872	0.251	0.802	0.385
1500	0.954	0.092	0.879	0.253	0.813	0.390

**Tabla 6.7.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=70 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S4E7 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S4E8 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S4E9 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.111	0.011	0.068	0.020	0.033	0.016
20	0.208	0.020	0.127	0.037	0.063	0.030
30	0.293	0.028	0.179	0.052	0.092	0.044
40	0.365	0.035	0.225	0.065	0.119	0.057
60	0.488	0.047	0.303	0.087	0.169	0.081
90	0.602	0.058	0.394	0.114	0.234	0.112
120	0.673	0.065	0.464	0.134	0.289	0.139
150	0.742	0.071	0.519	0.150	0.338	0.162
180	0.785	0.075	0.563	0.162	0.380	0.182
240	0.867	0.083	0.631	0.182	0.450	0.216
300	0.912	0.088	0.679	0.196	0.506	0.243
360	0.944	0.091	0.717	0.207	0.553	0.266
400	0.951	0.091	0.737	0.212	0.579	0.278
500	0.954	0.092	0.776	0.224	0.633	0.304
600	0.955	0.092	0.804	0.232	0.675	0.324
700	0.956	0.092	0.826	0.238	0.709	0.340
800	0.957	0.092	0.843	0.243	0.737	0.354
900	0.958	0.092	0.857	0.247	0.760	0.365
1000	0.959	0.092	0.868	0.250	0.779	0.374
1100	0.960	0.092	0.877	0.253	0.796	0.382
1200	0.961	0.092	0.885	0.255	0.810	0.389
1300	0.962	0.092	0.892	0.257	0.823	0.395
1400	0.962	0.092	0.898	0.259	0.834	0.400
1500	0.964	0.093	0.904	0.260	0.844	0.405

**Tabla 6.8.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=80 °C para el sistema anhidro

Tiempo (min)	S4E10 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S4E11 C <sub>10</sub> = 60 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C		S4E12 C <sub>10</sub> = 100 g·L <sup>-1</sup> T=80 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.170	0.016	0.080	0.023	0.070	0.034
20	0.280	0.027	0.140	0.040	0.130	0.062
30	0.350	0.034	0.200	0.058	0.170	0.082
40	0.410	0.039	0.250	0.072	0.210	0.101
60	0.550	0.053	0.330	0.095	0.270	0.130
90	0.660	0.063	0.410	0.118	0.330	0.158
120	0.730	0.070	0.480	0.138	0.370	0.178
150	0.790	0.076	0.520	0.150	0.400	0.192
180	0.860	0.083	0.560	0.161	0.420	0.202
240	0.910	0.087	0.620	0.179	0.450	0.216
300	0.950	0.091	0.650	0.187	0.480	0.230
360	0.960	0.092	0.680	0.196	0.490	0.235
400	0.970	0.093	0.710	0.205	0.500	0.240
500	0.970	0.093	0.720	0.207	0.510	0.245
600	0.980	0.094	0.750	0.216	0.530	0.254
700	0.980	0.094	0.760	0.219	0.530	0.254
800	0.980	0.094	0.780	0.225	0.540	0.259
900	0.980	0.094	0.790	0.228	0.550	0.264
1000	0.980	0.094	0.790	0.228	0.550	0.264
1100	0.980	0.094	0.800	0.230	0.550	0.264
1200	0.980	0.094	0.810	0.233	0.560	0.269
1300	0.980	0.094	0.810	0.233	0.560	0.269
1400	0.980	0.094	0.820	0.236	0.560	0.269
1500	0.980	0.094	0.820	0.236	0.560	0.269

### 6.1.2.2.- Formulación del modelo cinético

Se han propuestos varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno. Para seleccionar el más adecuado, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, comparándolos y discriminando entre ellos según criterios físicos y estadísticos de una forma similar a lo hecho en los capítulos anteriores de esta Memoria. La reacción de esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435 en presencia de un cosolvente (tolueno), como se ha mencionado en los capítulos 3,4 y 5; se ha llevado a cabo con un exceso de glicerina con respecto a la concentración inicial de ibuprofeno ( $C_{\text{glicerina}} \gg C_{\text{ibuprofeno}}$ ). En este sistema, en principio, hay que considerar la reacción directa, esterificación, y la inversa, hidrólisis. Así, la velocidad de reacción puede expresarse de acuerdo a la ecuación [3.2] del capítulo 3. Además, se ha considerado que la concentración de los productos de la reacción de esterificación son iguales ( $C_{\text{agua}} = C_{\text{éster}}$ ), llevando a una expresión muy próxima a la típica de Michaelis-Menten para un sustrato y un producto, quedando representada por la ecuación [6.1]. En el apartado 6.1.1.3 se realizó el estudio de la influencia de las limitaciones por transferencia de materia, por tanto, el factor de efectividad ( $\eta$ ) considerado en los modelos cinéticos es, aproximadamente, de 0,14 correspondiente al valor medio calculado para el preparado comercial formado por diversas fracciones de tamaños de partícula.

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{\text{ácido}} - k'_2 \cdot C_{\text{éster}}^2}{1 + K_{\text{ácido}} \cdot C_{\text{ácido}} + K_{\text{éster}} \cdot C_{\text{éster}}} \quad [6.1]$$

Este el caso en estudio, usando la forma inmovilizada de la CALB (Novozym 435), como se ha descrito en la sección de experimentos previos, la enzima se desactiva por efecto de la concentración del ácido (ibuprofeno) y de la temperatura. En este sentido, se propone el mecanismo de desactivación total irreversible, en un medio libre de disolvente representado en el esquema 1 del capítulo 5. Con todo ello, los modelos que se proponen para el sistema anhidro son los siguientes:

**Modelo 1:** Es un modelo hiperbólico reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno, y de orden dos con respecto a la

concentración de monoglicérido, representado por la ecuación [6.1], no tiene en cuenta desactivación química ni térmica.

**Modelo 2:** Es un modelo similar al anterior, con la diferencia que se considera una reacción de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y, además, se supone un mecanismo desactivación irreversible de la lipasa, mostrada en el esquema 1; también implica que la influencia de la concentración de ibuprofeno y la actividad remanente son lineales, es decir, de orden 1.

**Modelo 3:** Este modelo, similar al anterior, tiene en cuenta la reversibilidad de la reacción de esterificación y también una desactivación irreversible total.

**Modelo 4:** Este modelo es similar al modelo 3, pero añade una desactivación de la enzima lipasa debida a la acción de dos efectos: la concentración de ibuprofeno y la temperatura, siendo la velocidad de desactivación por temperatura de orden 1.

En la Tabla 6.9 se muestran las ecuaciones de la velocidad para cada uno de los modelos propuestos.

**Tabla 6.9.** Ecuación de velocidad para los diferentes modelos cinéticos propuestos

Modelo	Ecuación cinética
1	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
2	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
3	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
4	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_{dT} \cdot a_R + k_d \cdot a_R \cdot C_I$



### **6.1.2.3.- Selección del modelo cinético**

Como se comentó en los capítulos anteriores, 3, 4 y 5, se ha aplicado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden y el algoritmo de Marquardt-Levenberg para el ajuste de los modelos a los datos experimentales obtenidos. En la Tabla 6.10 se muestran los parámetros para cada uno de los modelos cinéticos propuestos, en este caso para el sistema anhidro. En la selección y discriminación de los modelos propuestos, el primer criterio físico considerado es el rango de valores de la energías de activación ( $E_a$ ) de las constantes cinéticas, cuyos valores se muestran en la Tabla 6.10; los modelos 1, 2 y 3, en la reacción de hidrólisis (reversa), las constantes cinéticas tienen una energía de activación de 177,32; 10,77 y 189,03 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. En cuanto a los valores de las constantes cinéticas de la reacción directa, los modelos 1, 2, 3 y 4 tienen energías de activación entre 31 y 34 kJ mol<sup>-1</sup>. Así, todos los modelos propuestos tienen valores de energía de activación de la reacción de hidrólisis que se encuentran dentro del intervalo de 2-200 kJ mol<sup>-1</sup>, normalmente admitido como válido en los modelos cinéticos para reacciones químicas. Otro criterio aplicado fue el signo positivo en todas las constantes de adsorción o de equilibrio, que se alcanzó para todos los modelos propuestos, como puede observarse en la Tabla 6.11. Por lo tanto, la discriminación de los modelos ha de realizarse atendiendo a los criterios estadísticos o de ajuste, ya que los criterios físicos se cumplen en todos los modelos. Ahora bien, el primer criterio estadístico considerado es el valor absoluto del error estándar (ver Tabla 6.11), éste se mantiene bajo para todas las constantes cinéticas y termodinámicas de los modelos propuestos, por lo que, al 95 % de confianza, el valor cero no está comprendido en el intervalo de confianza de ninguna constante, ya que dichos intervalos son bastantes estrechos. Analizando el parámetro p para todos los modelos propuestos, su valor es  $p < 0.0001$ , como se ha considerado en los modelos cinéticos para la esterificación de glicerina con ibuprofeno usando la lipasa CALB en su forma libre en tanto en el medio libre de disolvente como con cosolvente; este criterio también se ha utilizado en el caso del preparado Novozym 435 (Capítulos 3, 4 y 5).

En cuanto a otros criterios estadísticos de discriminación (ver Tabla 6.11), los valores más bajos del criterio de información de Akaike ( $AIC_c$ ) y del criterio de información bayesiano (BIC) son los del Modelo 2, mientras que el valor de F más alto es también del modelo 2, y el porcentaje de variación explicada (%VE) de este modelo cinético es también el más alto, aunque similar al del modelo 4.

**Tabla 6.10.** Valores de los parámetros, con el error estándar, para cada uno de los modelos cinéticos propuestos de la esterificación de glicerina con ibuprofeno para el sistema anhidro

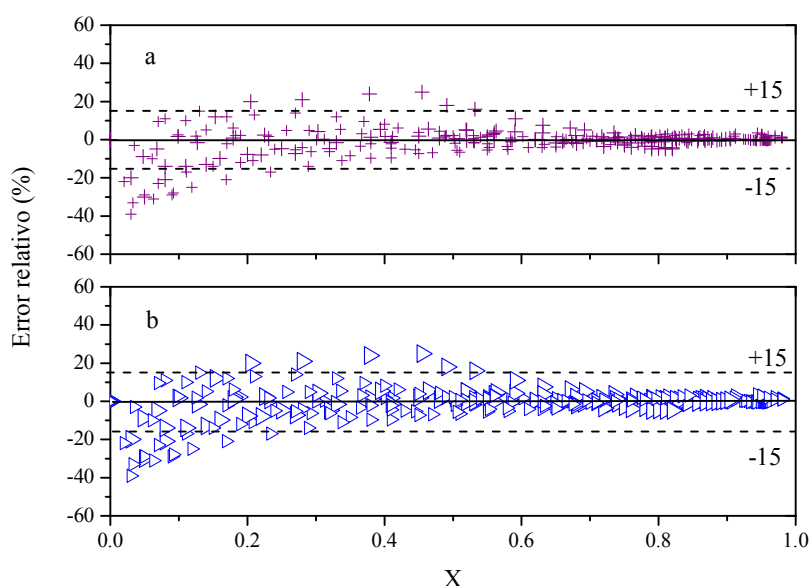
Modelo	Constante	Valor	Error
1	$\ln k'_{10}$	16.67	4.25
	$E_{a_{k'1}}/R$	3884	162
	$\ln k'_{20}$	96.88	21.51
	$E_{a_{k'2}}/R$	21329	2175
	$K_I$	5.06	0.51
	$K_{MG}$	54.87	6.20
2	$\ln k'_{10}$	4.57	0.28
	$E_{a_{k'1}}/R$	3888	93
	$\ln k'_{20}$	-3.94	1.91
	$E_{a_{k'2}}/R$	1296	637
	$\ln k_{d0}$	72.86	7.90
	$E_{a_{kd}}/R$	27207	2795
	$K_I$	9.90	0.89
	$K_{MG}$	44.36	3.90
3	$\ln k'_{10}$	8.91	1.34
	$E_{a_{k'1}}/R$	4124	110
	$\ln k_{d0}$	71.40	8.64
	$E_{a_{kd}}/R$	22738	1655
	$K_I$	5.45	0.32
	$K_{MG}$	60.20	4.67
4	$\ln k'_{10}$	4.00	0.31
	$E_{a_{k'1}}/R$	3754	103
	$\ln k_{d0}$	104.89	21.86
	$E_{a_{kd}}/R$	38591	7730
	$\ln k_{dT0}$	0.29	1.42
	$E_{a_{kdT}}/R$	2406	475
	$K_I$	8.46	0.60
	$K_{MG}$	29.48	2.85

**Tabla 6.11.** Valores estadísticos de cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno para el sistema anhidro

Modelo	F- Fisher	N <sub>dexp</sub>	K	SQR	N/K	AICc	BIC	RMSE	VE(%)
1	12578	300	6	0.481	50	-1918	-1930	0.040	98.26
2	<b>38313</b>	<b>300</b>	<b>8</b>	<b>0.118</b>	<b>37.5</b>	<b>-2335</b>	<b>-2351</b>	<b>0.020</b>	<b>99.57</b>
3	29399	300	6	0.211	50	-2165	-2177	0.027	99.24
4	36180	300	8	0.127	37.5	-2314	-2331	0.205	99.54

En las Figuras 6.8 a y b, se muestra la evolución del error relativo versus la conversión de ibuprofeno de los modelos 2 y 4, respectivamente, para todos los datos de los experimentos realizados en el caso del sistema anhidro. Al igual que en casos anteriores, el error experimental se estima en el intervalo de 15-20%. Para los modelos 2 y 4, por debajo de un valor de conversión de 0,2, se puede observar una sobreestimación con respecto a los datos experimentales, con valores negativos del error relativo, particularmente debido a que su varianza es mayor; mientras que por encima de este valor de conversión, el error relativo se encuentra dentro de los límites del error experimental para ambos modelos.

Así, tanto el modelo 2 como el modelo 4 tienen una alta bondad de ajuste, con intervalos de confianza muy estrechos para las constantes cinéticas, al igual que los otros parámetros estadísticos, de hecho el error relativo en ambos modelos tiene un valor muy similar. En ningún caso se observa tendencia en el error.



**Figura 6.8.** Error relativo *versus* la conversión para:

- a) Modelo 2: hiperbólico reversible de pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster con desactivación total de orden 1 respecto al ibuprofeno.
- b) Modelo 4: hiperbólico irreversible pseudo-orden 1 para ibuprofeno y monoéster con desactivación total de orden 1 respecto al ibuprofeno y desactivación térmica de orden 1.

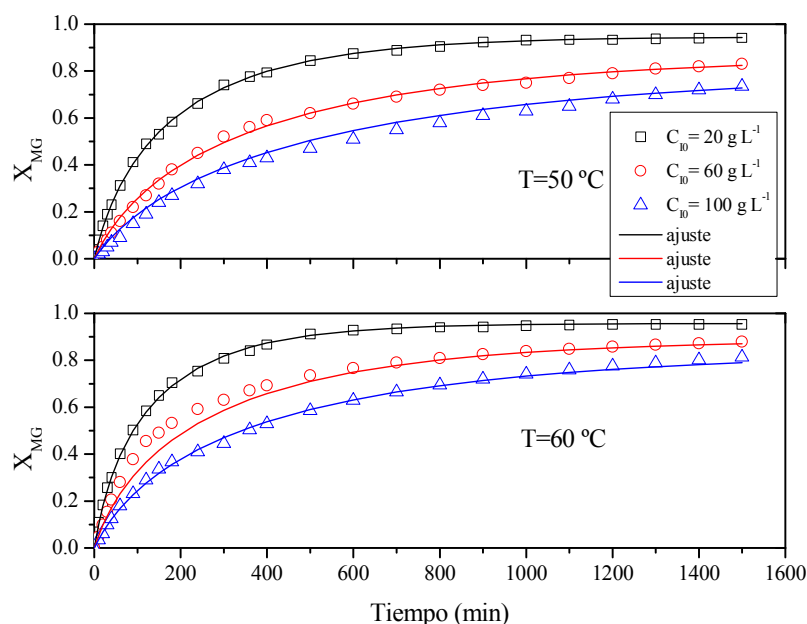
Por lo anteriormente mencionado, el mejor modelo de los propuestos para el sistema anhidro, parece ser el modelo 2, el cual sugiere un modelo hiperbólico

reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y orden 2 con respecto a la concentración de monoéster con desactivación química total de orden 1 respecto al ibuprofeno, siendo representado por las ecuaciones [6.2] y [6.3], donde se incluyen el valor de los parámetros y sus intervalos de confianza.

$$r = \frac{\exp\left(4,57 \pm 0,28 - \frac{3888 \pm 93}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - \exp\left(-3,94 \pm 1,91 - \frac{1296 \pm 637}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + 9,90 \pm 0,89 \cdot C_I + 44,36 \pm 3,90 \cdot C_{MG}} \quad [6.2]$$

$$-\frac{da_R}{dt} = \exp\left(72,86 \pm 7,90 - \frac{27207 \pm 2795}{T}\right) \cdot C_I \quad [6.3]$$

En las Figuras 6.9 y 6.10 se muestra la reproducción que proporciona este modelo 2 de los datos experimentales para todas las concentraciones iniciales de ibuprofeno y todas las temperaturas estudiadas para el sistema anhidro “sin agua”. Como puede se puede apreciar, los ajustes son muy buenos para todas las concentraciones de ibuprofeno y temperaturas establecidas, aunque se observan pequeñas desviaciones para una concentración de ibuprofeno de 60 g·L<sup>-1</sup>, a tiempos por debajo de 400 min, tanto a T= 60 °C como a T=80 °C, a tiempos altos, por encima de 800 min.



**Figura 6.9.** Ajuste del Modelo 2 anhidro a una temperatura de 50 y 60 °C

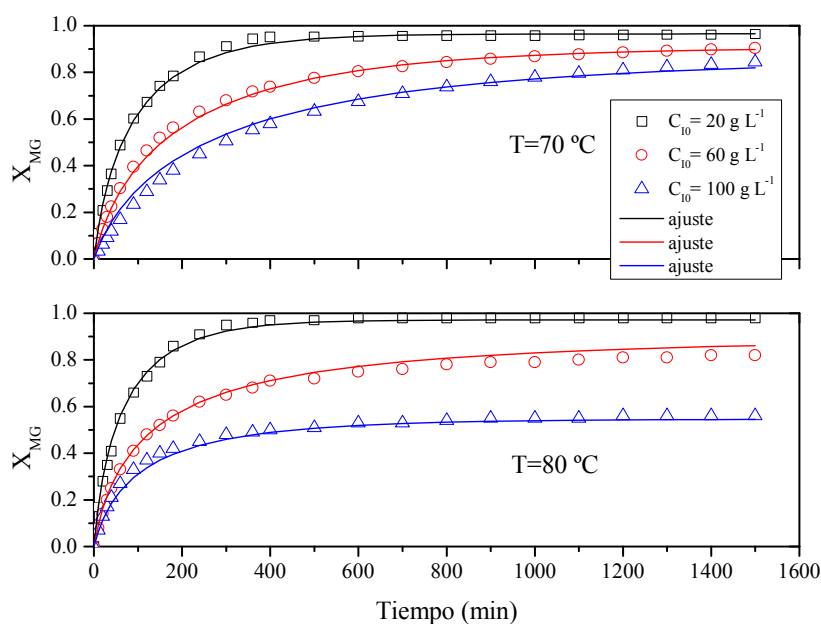


Figura 6.10. Ajuste del Modelo 2 para el sistema anhidro a una temperatura de 70 y 80 °C

## 6.2.- ESTUDIO del SISTEMA con AGUA AÑADIDA

### 6.2.1.- Experimentos previos

Debido a los resultados de los experimentos realizados en el estudio de la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno añadiendo una cierta cantidad de agua, se decidió evaluar el efecto de la presencia del agua en las velocidades de la transferencia de materia, de la reacción de esterificación, así como el efecto sobre la desactivación enzimática. En este estudio, se fijó la concentración de enzima en el valor utilizado previamente:  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , igual que en el estudio previo del sistema anhidro “sin agua”.

#### 6.2.1.1.- Estudio de la transferencia de materia

Se ha evaluado el efecto de la velocidad de agitación y tamaño de partícula del biocatalizador en la esterificación de la glicerina con ibuprofeno catalizada por el preparado Novozym 435 en presencia de un cosolvente y una concentración de agua del 7,4 % v/v y, de esta manera determinar los posibles problemas difusionales en la película externa y en el interior de la matriz porosa del biocatalizador.

#### *Transferencia de Materia Externa*

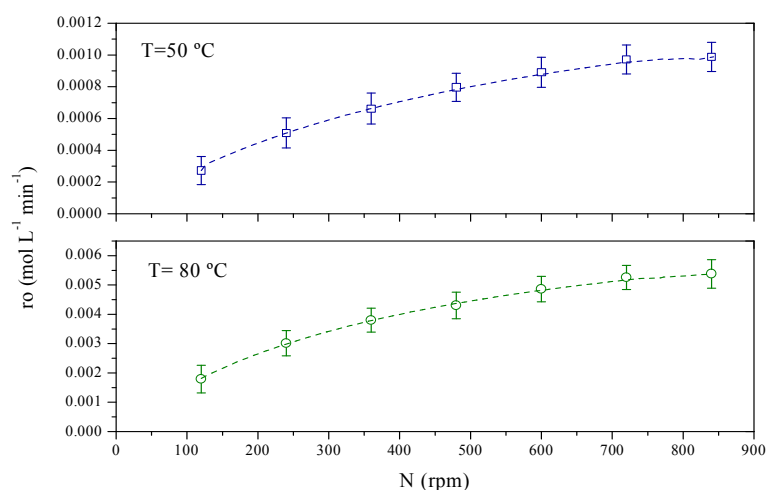
La influencia de la velocidad de agitación fue estudiada a dos temperaturas, 50 y 80 °C; la agitación se varió en el mismo intervalo usado en el sistema anhidro en el

apartado 6.1.1.3, entre 120 y 840 rpm. Como puede apreciarse en la Figura 6.11, a una temperatura de 50 °C, la velocidad inicial de esterificación aumenta con el aumento de la velocidad de agitación; el mismo comportamiento ocurre a 80 °C; como es lógico a esta última temperatura los valores de la velocidad de reacción son mayores que a 50 °C. Se puede observar que a bajas velocidades de agitación, el contacto entre las fases es deficiente, el tolueno es inmiscible en la glicerina y en el agua presente en el medio de reacción, pero este contacto se incrementa hasta un punto donde no hay cambios significativos en la velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno, para un valor de la agitación de 600-840 rpm.

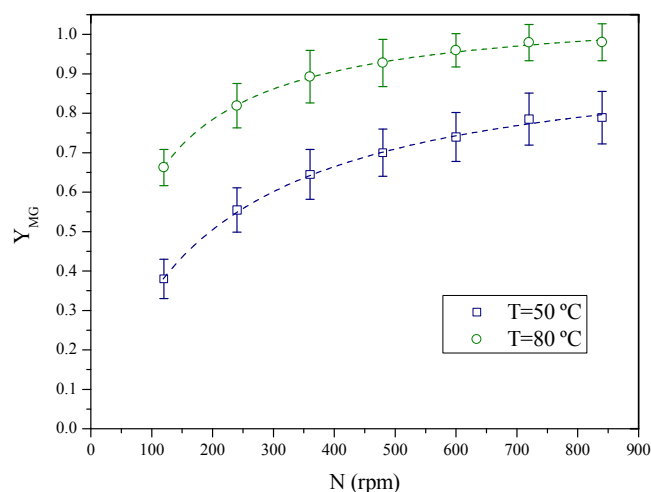
Por otro lado, el rendimiento final del monoéster de ibuprofeno (MG) alcanzado en la esterificación a una temperatura de 50 y 80 °C, se muestra en la Figura 6.12. En ella se puede observar que un incremento en la velocidad de agitación hasta 600 rpm produce un incremento en el rendimiento final a monoéster de ibuprofeno (MG); sin embargo, con un incremento adicional de la velocidad de agitación de 720 hasta 800 rpm, el rendimiento a monoéster no presenta cambios significativos, al menos por encima del error experimental estimado. Además, la adición de una concentración de 7,4 %v/v de agua conlleva un aumento del rendimiento final de MG en comparación con el sistema anhidro. Por tanto, se ha asumido que las posibles limitaciones del transporte de materia externas no son significativas si se emplean agitaciones a partir de 720 rpm, siendo la cantidad del monoéster de ibuprofeno (MG) formado independiente de la velocidad de agitación en las condiciones descritas.

Como en casos anteriores, el módulo de Mears (calculado empleando la ecuación [5.1]) fue aplicado para comprobar las conclusiones alcanzadas. En la Tabla 6.12 se muestran los valores de viscosidad de la mezcla glicerina-tolueno-agua y difusividad molecular; la viscosidad de la mezcla fue determinada experimentalmente con un viscosímetro de cilindros concéntricos y la difusividad molecular por medio de la ecuación [5.6]. El criterio de Mears establece que si  $C_M < 0,15$  se pueden despreciar las limitaciones por la transferencia de materia externa. Como se puede ver en la Tabla 6.13, el valor de la velocidad de transferencia de materia ( $k_L \cdot a \cdot C_{I0}$ ) es mucho mayor que la velocidad inicial de esterificación, lo cual conlleva a que los valores de  $Me$  sean significativamente menores a 0,15. Por tanto, para establecer un buen contacto entre las fases presentes en el medio de reacción, se elige un valor de la velocidad de agitación de 720 rpm para la realización de la experimentación posterior. En este caso, la adición de

agua al medio de reacción conlleva un incremento de la velocidad de transferencia de materia ( $k_L \cdot a \cdot C_{I0}$ ) y de la velocidad inicial de esterificación, con respecto al sistema anterior, sin adición de agua. A una temperatura de 50 °C, los valores de  $k_L \cdot a \cdot C_{I0}$  del sistema con agua son 1,3 veces mayores que los valores  $k_L \cdot a \cdot C_{I0}$  del sistema anhidro, mientras que a 80 °C, son 1,6 veces más altos. De igual manera, la velocidad inicial de esterificación del sistema con agua a 50 °C es 1,1 veces más alta que en el sistema anhidro y, a 80 °C la  $r_{obs}$  en el sistema con agua aumenta hasta casi el doble.



**Figura 6.11.** Efecto de la velocidad de agitación en la velocidad inicial de esterificación. Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T=50$  y  $80^\circ\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g L}^{-1}$ ,  $C_w=7,4 \text{ \% v/v}$ ; Gli/Tol=20/5



**Figura 6.12.** Efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento de monoéster de ibuprofeno. Condiciones:  $C_{I0}=100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T=50$  y  $80^\circ\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g L}^{-1}$ ;  $C_w=7,4 \text{ \% v/v}$ ; Gli/Tol=20/5

**Tabla 6.12.** Valores de difusividad molecular, viscosidad de la glicerina-tolueno-agua estimadas en el intervalo de temperatura de operación del sistema

T(°C)	$D_{ij} \times 10^{11} (\text{m}^2 \text{s}^{-1})$	$\mu_m (\text{Kg m}^{-1} \text{s}^{-1})$
50	6.27	0.038
60	18.3	0.014
70	28.9	0.009
80	36.4	0.007

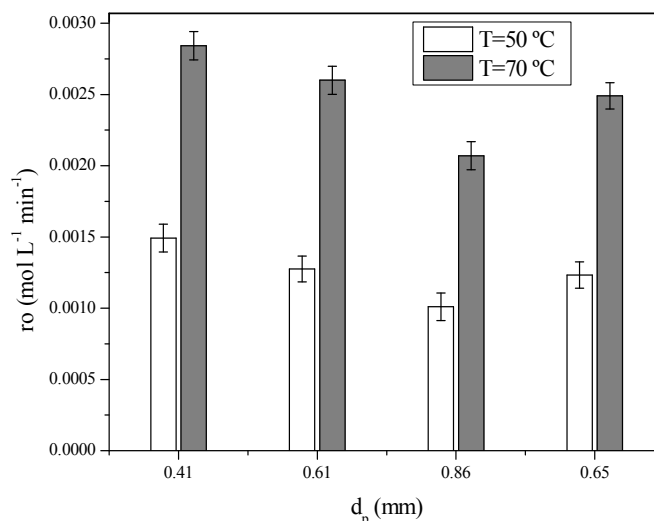
**Tabla 6.13.** Valores para aplicar el Criterio de Mears a distintas temperaturas y velocidades de agitación

T (°C)	N (rpm)	$r_{\text{obs}} \times 10^4 (\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1})$	$k_L a' C_{10} (\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1})$	Me $\times 10^4$
50	600	17.7	2.65	3.33
	720	19.5	2.90	3.36
	840	19.8	3.14	3.18
80	600	48.6	11.5	2.12
	720	52.6	12.5	2.10
	840	53.8	13.6	1.98

### **Transferencia de Materia Interna**

Al igual que en el sistema anhidro, se ha evaluado el efecto del tamaño de partícula del biocatalizador usando la mismas fracciones: 0,32-0,5; 0,5-0,7 y 0,7-1 mm, y las condiciones de operación:  $C_{10}=60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T= 50$  y  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $C_E=30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $N=720 \text{ rpm}$ , ahora empleando una  $C_w=7,4 \text{ \%v/v}$ . En la Figura 6.13 se muestra la velocidad inicial de esterificación frente a distintos diámetro de partícula ( $d_p$ ) para cada una de las temperaturas consideradas. La velocidad inicial de esterificación disminuye a medida que aumenta el tamaño de partícula, por tanto, deben existir problemas de difusión en el interior de la partícula del biocatalizador, el mismo comportamiento observado en el sistema anhidro. Además, la presencia de una concentración de agua del 7,4 % v/v conlleva un aumento en la velocidad inicial de esterificación para cada tamaño de partícula en comparación con el sistema anhidro.





**Figura 6.13.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina con ibuprofeno *versus* distintos tamaños de partículas de Novozym 435. Condiciones:  $C_{I0}=60$  g·L<sup>-1</sup>;  $T=50$  y  $70$  °C;  $C_E=30$  g L<sup>-1</sup>;  $N=720$  rpm y  $C_w=7,4$  %v/v y Gli/Tol=20/5

Como en los sistemas anteriores, se procedió a comprobar la posible existencia de limitaciones por difusión interna, determinando el factor de efectividad ( $\eta$ ) con las ecuaciones de [5.8] a [5.9] siguiendo el mismo procedimiento establecido en el caso del sistema anhidro descrito en el apartado 5.1.2. En la Tabla 6.14 se muestran los valores de factor de efectividad, a las temperaturas consideradas. Se puede observar, como en el caso anterior (sistema anhidro), que los valores del factor de efectividad son menores de 1, presentando valores entre 0,32 y 0,66. Estos valores disminuyen a medida que aumenta la temperatura. Sin embargo, el hecho de agregar una concentración de 7,4 %v/v de agua supone un aumento en la velocidad inicial de esterificación y, no obstante, los valores del factor de efectividad son mayores con respecto al sistema anhidro (0,12-0,25). Esto solo puede ser debido a que la velocidad de transferencia de materia ha aumentado también. Al igual que en el sistema anhidro, el factor de efectividad medio, calculado por ponderación de las distintas fracciones másicas con diferente tamaño de partícula, se encuentra muy cercano al valor medido para el tamaño de partícula intermedio, que tiene mayor porcentaje en peso de la fracción (0,5-0,7 mm).

Como en los sistemas estudiados anteriores, para este sistema también fue determinado el módulo de Weisz-Prater (We-Pt) usando la ecuación [5.12] y el valor del coeficiente de difusión efectivo ( $D_e$ ) fue calculado por la ecuación [5.13]. Para este estudio, se ha supuesto que la relación  $\sigma/\tau$  tiene un valor de 0,1; siendo los valores del

factor de constricción de 0,5 y tortuosidad de 5, debido a que ahora la mezcla tolueno-agua lleva a un mayor hinchamiento de la resina presente en el preparado Novozym 435. En la Tabla 6.14 se presentan los valores del coeficiente de difusión efectivo y del módulo de We-Pt, se puede apreciar que los valores del coeficiente difusivo ( $D_e$ ) aumentan significativamente con la temperatura, debido a la notable disminución de la viscosidad por la presencia de la cantidad de agua 7,4 %v/v y, también, por el aumento de la temperatura; esto lleva consigo que la velocidad de transporte aumente casi lo mismo que la velocidad de reacción, y, por tanto, el factor de efectividad sea tan parecido a diferentes temperaturas. En cuanto a los valores del módulo de We-Pt son mayores a la unidad y, se encuentran en el intervalo  $0,3 < \text{We-Pt} < 3$ , por tanto, puede ser que exista una influencia de la transferencia de materia y hay que determinar dicha influencia en la velocidad de reacción, según este criterio aproximado.

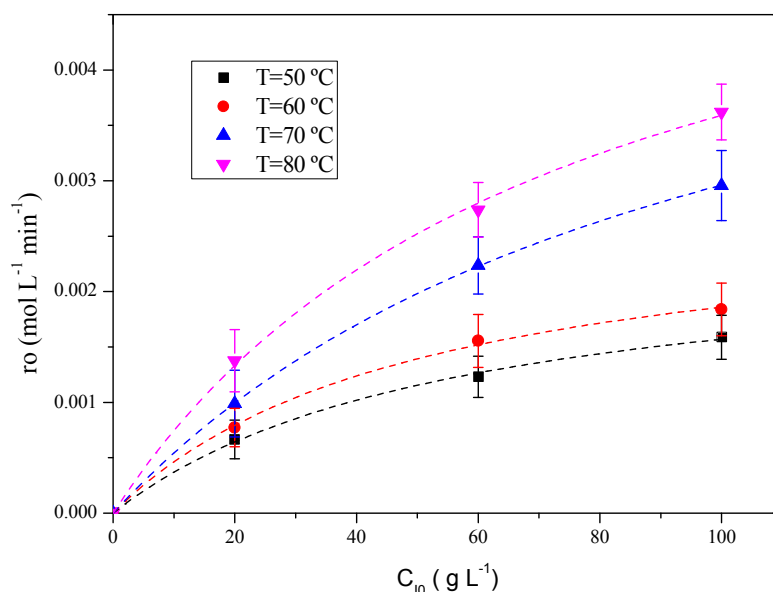
**Tabla 6.14.** Valores del coeficiente difusivo efectivo, factor de efectividad y módulo de We-Pt a distintas temperaturas

T (°C)	$D_{ij} \times 10^{11}$ ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )	$D_e \times 10^{11}$ ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ )	Fracción % w/w	Tamaño partícula (mm)	$r_{\text{obs}} \times 10^4$ Novozym 435 ( $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$\eta$	We-Pt
50	6.27	3.13	13	0.32-0.5	14.9	0.66	1.15
			52	0.5-0.7	12.8	0.57	2.14
			35	0.7-1	10.1	0.45	3.42
			Media	0.3-1	12.3	0.55	2.38
70	28.9	14.5	13	0.32-0.5	28.4	0.45	0.47
			52	0.5-0.7	26.0	0.41	0.94
			35	0.7-1	20.7	0.32	1.52
			Media	0.3-1	24.9	0.40	1.04

#### 6.2.1.2.- Efecto de la concentración inicial de ibuprofeno y de la temperatura

Como en el sistema anterior descrito en el apartado 6.1.1.4, el posible efecto inhibitor del reactivo (ibuprofeno) en la esterificación enzimática del ibuprofeno con glicerina se estudió variando la cantidad inicial de ibuprofeno entre 20 a 100  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , así como la posible desactivación de la enzima se estudió variando la temperatura entre 50 y 80 °C, manteniendo en todos los casos constantes la concentración de enzima Novozym 435 en 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , la relación Gli/Tol en 20/5 y la concentración de agua en 7,4%v/v. En la Figura 6.14, se puede apreciar que, a temperaturas de 50, 60, 70 y 80 °C, la velocidad inicial de la esterificación aumenta con la concentración inicial de ibuprofeno de manera hiperbólica, siguiendo la tendencia típica explicada por un

mecanismo de Michaelis y Menten. Este comportamiento es muy similar al encontrado en el sistema anhidro. Sin embargo, la presencia de una concentración de agua en el medio de reacción trae como consecuencia un valor ligeramente más alto del rendimiento en monoéster a una concentración de ibuprofeno de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y una temperatura de  $80^\circ\text{C}$ . Por tanto, ningún efecto de desactivación fue observado en este caso, incluso a altas temperaturas y concentraciones del ácido (ibuprofeno).



**Figura 6.14.** Velocidad inicial de esterificación de glicerina e ibuprofeno *versus* la concentración inicial de ibuprofeno, sistema con agua añadida

### 6.2.2.- Determinación del modelo cinético

En este apartado, se hace la propuesta del modelo cinético y la selección del modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales obtenidos, de esta manera se da cumplimiento al objetivo 2 al comienzo de este capítulo.

#### 6.2.2.1.- Resultados de los experimentos cinéticos

En la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 con tolueno como cosolvente, de acuerdo con los experimentos previos, las condiciones de operación empleadas han sido: intervalo de temperatura de  $50$  a  $80^\circ\text{C}$ , concentración inicial de ibuprofeno de  $20$  a  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , concentración de enzima de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , velocidad de agitación de  $720 \text{ rpm}$  y concentración de agua de  $7,4\% \text{ v/v}$ . En la Tabla 6.15 se muestran los experimentos realizados para el sistema con agua y, en las Tablas de 6.16 a 6.19, los resultados

experimentales obtenidos en dichos experimentos para el sistema con una cierta concentración de agua (7,4 % v/v).

**Tabla 6.15.** Experimentos realizados para el sistema con enzima inmovilizada (Novozym 435) con cosolvente, sin y con agua añadida

<b>Experimento</b>	<b>C<sub>w</sub> (% v/v)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>C<sub>10</sub> (g·L<sup>-1</sup>)</b>
S4E13	7.4	50	20
S4E14	7.4	50	60
S4E15	7.4	50	100
S4E16	7.4	60	20
S4E17	7.4	60	60
S4E18	7.4	60	100
S4E19	7.4	70	20
S43E20	7.4	70	60
S4E21	7.4	70	100
S4E22	7.4	80	20
S4E23	7.4	80	60
S4E24	7.4	80	100

**Tabla 6.16.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=50 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S4E16 $C_{I0}= 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=50 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S4E17 $C_{I0}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=50 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S4E18 $C_{I0}= 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=50 \text{ }^{\circ}\text{C}$	
	$X_{MG}$	$C_{MG} (\text{mol L}^{-1})$	$X_{MG}$	$C_{MG} (\text{mol L}^{-1})$	$X_{MG}$	$C_{MG} (\text{mol L}^{-1})$
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.085	0.008	0.047	0.014	0.035	0.017
20	0.157	0.015	0.089	0.026	0.068	0.033
30	0.217	0.021	0.129	0.038	0.099	0.048
40	0.270	0.026	0.165	0.048	0.128	0.062
60	0.355	0.034	0.229	0.067	0.180	0.087
90	0.450	0.044	0.308	0.090	0.249	0.121
120	0.520	0.050	0.374	0.109	0.308	0.149
150	0.573	0.056	0.428	0.124	0.358	0.174
180	0.615	0.060	0.474	0.138	0.402	0.195
240	0.677	0.066	0.548	0.159	0.475	0.230
300	0.721	0.070	0.605	0.176	0.533	0.258
360	0.753	0.073	0.649	0.189	0.580	0.281
400	0.770	0.075	0.674	0.196	0.607	0.294
500	0.803	0.078	0.724	0.211	0.663	0.321
600	0.827	0.080	0.761	0.221	0.705	0.342
700	0.845	0.082	0.791	0.230	0.740	0.359
800	0.859	0.083	0.814	0.237	0.767	0.372
900	0.870	0.084	0.833	0.242	0.791	0.383
1000	0.879	0.085	0.849	0.247	0.810	0.393
1100	0.887	0.086	0.863	0.251	0.827	0.401
1200	0.893	0.087	0.875	0.255	0.841	0.408
1300	0.899	0.087	0.885	0.257	0.854	0.414
1400	0.903	0.088	0.894	0.260	0.865	0.419
1500	0.907	0.088	0.901	0.262	0.875	0.424

**Tabla 6.17.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=60 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S4E19 $C_{10}= 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=60 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S4E20 $C_{10}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=60 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S4E21 $C_{10}= 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=60 \text{ }^{\circ}\text{C}$	
	$X_{\text{MG}}$	$C_{\text{MG}} (\text{mol L}^{-1})$	$X_{\text{MG}}$	$C_{\text{MG}} (\text{mol L}^{-1})$	$X_{\text{MG}}$	$C_{\text{MG}} (\text{mol L}^{-1})$
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.103	0.010	0.061	0.018	0.042	0.020
20	0.187	0.018	0.115	0.033	0.080	0.039
30	0.256	0.025	0.163	0.047	0.115	0.056
40	0.314	0.030	0.207	0.060	0.148	0.072
60	0.406	0.039	0.281	0.082	0.207	0.100
90	0.505	0.049	0.371	0.108	0.282	0.137
120	0.575	0.056	0.441	0.128	0.345	0.167
150	0.627	0.061	0.497	0.145	0.397	0.192
180	0.667	0.065	0.544	0.158	0.442	0.214
240	0.726	0.070	0.615	0.179	0.515	0.250
300	0.766	0.074	0.668	0.194	0.572	0.277
360	0.795	0.077	0.709	0.206	0.617	0.299
400	0.811	0.079	0.731	0.213	0.642	0.311
500	0.840	0.081	0.775	0.225	0.694	0.336
600	0.861	0.083	0.807	0.235	0.733	0.355
700	0.877	0.085	0.831	0.242	0.764	0.370
800	0.889	0.086	0.851	0.248	0.788	0.382
900	0.899	0.087	0.867	0.252	0.809	0.392
1000	0.906	0.088	0.880	0.256	0.826	0.400
1100	0.913	0.089	0.891	0.259	0.840	0.407
1200	0.919	0.089	0.900	0.262	0.853	0.414
1300	0.923	0.089	0.908	0.264	0.864	0.419
1400	0.927	0.090	0.915	0.266	0.873	0.423
1500	0.931	0.090	0.921	0.268	0.882	0.428

**Tabla 6.18.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=70 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S4E19 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S4E20 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C		S4E21 C <sub>10</sub> = 20 g·L <sup>-1</sup> T=70 °C	
	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	X <sub>MG</sub>	C <sub>MG</sub> (mol L <sup>-1</sup> )
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.140	0.014	0.106	0.031	0.084	0.041
20	0.246	0.024	0.192	0.056	0.155	0.075
30	0.329	0.032	0.263	0.076	0.217	0.105
40	0.397	0.038	0.323	0.094	0.270	0.131
60	0.499	0.048	0.419	0.122	0.358	0.174
90	0.602	0.058	0.521	0.152	0.457	0.222
120	0.671	0.065	0.594	0.173	0.531	0.257
150	0.721	0.070	0.649	0.189	0.588	0.285
180	0.759	0.074	0.691	0.201	0.633	0.307
240	0.812	0.079	0.752	0.219	0.701	0.340
300	0.847	0.082	0.794	0.231	0.748	0.363
360	0.872	0.085	0.825	0.240	0.784	0.380
400	0.886	0.086	0.841	0.245	0.803	0.389
500	0.911	0.088	0.872	0.254	0.840	0.407
600	0.928	0.090	0.894	0.260	0.867	0.420
700	0.941	0.091	0.911	0.265	0.887	0.430
800	0.951	0.092	0.923	0.268	0.902	0.437
900	0.959	0.093	0.934	0.272	0.915	0.444
1000	0.965	0.094	0.942	0.274	0.925	0.448
1100	0.970	0.094	0.949	0.276	0.933	0.452
1200	0.975	0.095	0.955	0.278	0.941	0.456
1300	0.978	0.095	0.960	0.279	0.947	0.459
1400	0.982	0.095	0.964	0.280	0.952	0.462
1500	0.985	0.096	0.968	0.282	0.957	0.464

**Tabla 6.19.** Resultados de experimentos de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno enzima inmovilizada Novozym 435 a T=80 °C para el sistema con agua

Tiempo (min)	S4E22 $C_{10}= 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S4E22 $C_{10}= 60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$		S4E24 $C_{10}= 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{T}=80 \text{ }^{\circ}\text{C}$	
	$X_{\text{MG}}$	$C_{\text{MG}} (\text{mol L}^{-1})$	$X_{\text{MG}}$	$C_{\text{MG}} (\text{mol L}^{-1})$	$X_{\text{MG}}$	$C_{\text{MG}} (\text{mol L}^{-1})$
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.283	0.027	0.187	0.054	0.096	0.047
20	0.441	0.043	0.315	0.092	0.176	0.085
30	0.542	0.053	0.408	0.119	0.243	0.118
40	0.612	0.059	0.479	0.139	0.300	0.145
60	0.703	0.068	0.579	0.168	0.393	0.191
90	0.780	0.076	0.674	0.196	0.495	0.240
120	0.826	0.080	0.734	0.213	0.569	0.276
150	0.856	0.083	0.775	0.225	0.624	0.303
180	0.877	0.085	0.805	0.234	0.668	0.324
240	0.905	0.088	0.846	0.246	0.732	0.355
300	0.922	0.089	0.873	0.254	0.777	0.377
360	0.934	0.091	0.892	0.259	0.810	0.393
400	0.943	0.091	0.906	0.264	0.835	0.405
500	0.950	0.092	0.917	0.267	0.855	0.414
600	0.960	0.093	0.932	0.271	0.885	0.429
700	0.965	0.094	0.942	0.274	0.903	0.438
800	0.970	0.094	0.948	0.276	0.917	0.445
900	0.973	0.094	0.954	0.277	0.928	0.450
1000	0.975	0.095	0.958	0.279	0.937	0.454
1100	0.978	0.095	0.962	0.280	0.945	0.458
1200	0.980	0.095	0.965	0.281	0.951	0.461
1300	0.981	0.095	0.968	0.282	0.956	0.463
1400	0.982	0.095	0.970	0.282	0.961	0.466
1500	0.984	0.095	0.972	0.283	0.965	0.468



#### 6.2.2.2.- Formulación del modelo cinético

En esta sección se hace la propuesta de varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales de la esterificación enzimática de glicerina e ibuprofeno catalizada por la Novozym 435 con cosolvente y una concentración inicial de agua añadida del 7,4 %v/v. Para la selección del modelo cinético más adecuado, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, discriminando entre ellos considerando criterios físicos y estadísticos de una forma similar a lo hecho en el apartado 6.1.2.3. Para este caso en estudio, se supone que la concentración de glicerina y del agua se encuentran en un gran exceso con respecto a la concentración de ibuprofeno y monoéster ( $C_{\text{ibuprofeno}} \gg C_{\text{éster}}$  y  $C_{\text{agua}} \gg C_{\text{éster}}$ ), por tanto, la ecuación de velocidad de reacción es similar a la propuesta en los modelos cinéticos usando la lipasa CALB en su forma libre del capítulo 3 de esta Memoria, la cual viene dada por la ecuación [6.4]. Además, en el apartado 6.2.1.1, se realizó el estudio de la influencia de las limitaciones por transferencia de materia; por tanto, se considera un valor de 0,48 para el factor de efectividad ( $\eta$ ) en los modelos cinéticos propuestos.

$$r = \frac{k_1' \cdot C_{\text{ácido}} - k_2' \cdot C_{\text{éster}}}{1 + K_{\text{ácido}} \cdot C_{\text{ácido}} + K_{\text{éster}} \cdot C_{\text{éster}}} \quad [6.4]$$

Los modelos propuestos para este sistema con agua son los siguientes:

**Modelo 5:** Modelo hiperbólico reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y la concentración de monoéster sin desactivación de la lipasa por efecto de la concentración de ibuprofeno y temperatura.

**Modelo 6:** Modelo hiperbólico de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y concentración de monoéster; supone, además, que se da una desactivación irreversible de la enzima, usando el mismo mecanismo mostrado en el esquema 1 (Capítulo 5), siendo de orden 1 respecto a la concentración de ibuprofeno y de la actividad remanente.

**Modelo 7:** Un modelo similar al modelo 5, con la diferencia de que en este modelo se considera solo la reacción directa, siendo de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de monoéster.

**Modelo 8:** Modelo similar al anterior, pero en este caso se considera el mecanismo de desactivación irreversible de la enzima mostrada en el modelo 6.

En la Tabla 6.20 se muestran las ecuaciones de la velocidad para cada uno de los modelos propuestos.

**Tabla 6.20.** Ecuación de velocidad para los diferentes modelos cinéticos propuestos

Modelo	Ecuación cinética
5	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
6	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
7	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
8	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$

### 6.2.2.3.- Selección del modelo cinético

Como se ha descrito en el apartado anterior, se ha aplicado el algoritmo de Marquardt-Levenberg y algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden para el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales. En la Tabla 6.21 se muestran los parámetros cinéticos y estadísticos calculados para cada uno de los modelos cinéticos propuestos para este sistema con adición de agua. Siguiendo la misma metodología que en la selección y discriminación de modelos utilizada anteriormente, el primer criterio físico considerado es el intervalo de valores de las energías de activación ( $E_a$ ) de las constantes cinéticas, que se muestran en la Tabla 6.21.

En este sistema con adición de agua, las constantes cinéticas de la reacción directa tienen una energía de activación entre 39,6 y 43,2 kJ mol<sup>-1</sup>; no obstante, para la reacción de hidrólisis, los valores de las constantes cinéticas tienen una energía de activación de 14,0 kJ mol<sup>-1</sup>. Como el caso del sistema anhidro, las constantes cinéticas de los modelos propuestos tienen valores de energía de activación que se encuentran dentro del intervalo de 2-200 kJ mol<sup>-1</sup>, usualmente admitido en los modelos cinéticos

para reacciones químicas. Otro criterio aplicado fue el signo positivo en todas las constantes de adsorción o de equilibrio, que no se alcanzó para todos los modelos propuestos; como puede observarse en la Tabla 6.21, los valores de las constantes son positivos para los modelos 5 y 6, pero en los modelos 7 y 8 el valor de  $K_L$  toma un valor negativo; por tanto, estos últimos modelos no son considerados en la discriminación posterior. A partir de este punto, la discriminación de los modelos 5 y 6 ha de ser realizada únicamente sobre la base de criterios estadísticos, ya que los criterios físicos se cumplen en ellos. Ahora bien, el primer criterio estadístico considerado es el valor absoluto del error estándar (Tabla 6.21), éste se mantiene constante para todos los parámetros de los modelos propuestos. Sin embargo, se observa en el modelo 6 que el error estándar para la constante de desactivación ( $\ln k_{d0}$ ) y la energía de activación de desactivación ( $E_{akd}$ ) es muy grande, de hecho comprende el valor cero en el intervalo de confianza, por tanto, el modelo 6 no es asumible. Por una razón similar, el parámetro  $E_{akd}$  en el modelo 8 también es rechazable.

En cuanto a otros criterios estadísticos de discriminación (Tabla 6.22), el modelo 5 tiene el valor más alto de la F de Fisher, el modelo 8 tiene los valores más bajos del criterio de información Akaike ( $AIC_C$ ) y del criterio de información bayesiano (BIC), ambos modelos presentan valores muy parecidos del porcentaje de variación explicada (%VE), y, en cuanto a RMSE, el valor es más bajo en el modelo 5, sin embargo el valor de RSS es más bajo en el modelo 8.

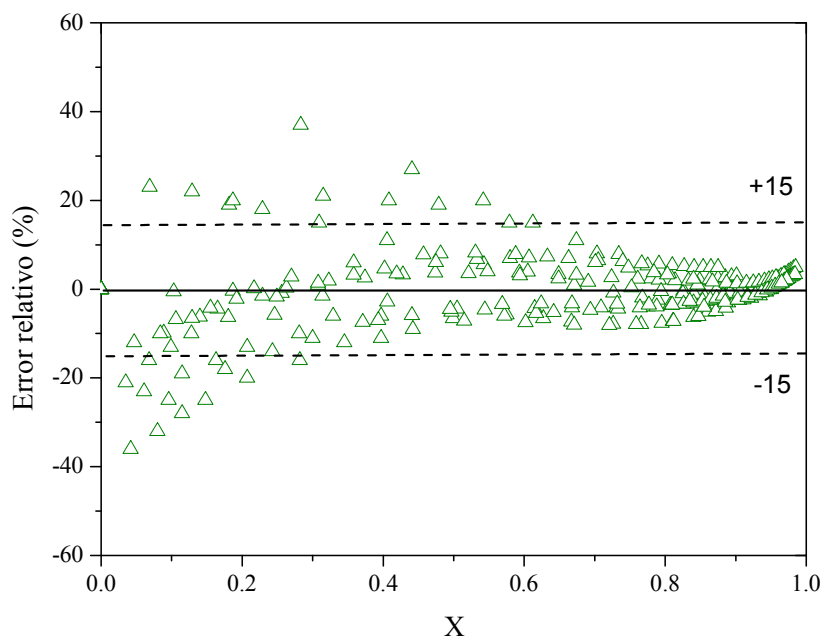
En las Figura 6.15, se muestra la evolución del error relativo del modelo 5 versus la conversión de ibuprofeno, para todos los datos de los experimentos realizados para el sistema con agua. Para una conversión menor a 0,2 se observa, en algunos valores negativos de error relativo, una sobrestimación con respecto a los datos experimentales, también para una conversión menor a 0,6, se presenta esta misma tendencia en algunos valores positivos del error relativo siendo dicho error relativo alto, mientras que por encima de estos dos valores (0,2 y 0,6) el error absoluto es mayor y la varianza es menor, lo que conduce a desviaciones bajas, estando el error relativo dentro de los límites del error experimental.

**Tabla 6.21.** Valores físicos con error estándar para cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno para el sistema con agua

Modelo	Parámetro	Valor	Error
5	$\ln k'_{10}$	6.69	0.38
	$E_{ak'1/R}$	4766	129
	$\ln k'_{20}$	-5.00	1.73
	$E_{ak'2/R}$	1689	583
	$K_I$	1.55	0.31
	$K_{MG}$	14.70	0.98
6	$\ln k'_{10}$	7.04	0.43
	$E_{ak'1/R}$	4889	146
	$\ln k'_{20}$	-5.10	1.75
	$E_{ak'2/R}$	1695	589
	$\ln k_{d0}$	225	9097
	$E_{akd/R}$	81550	3212980
	$K_I$	1.56	0.31
	$K_{MG}$	14.00	1.10
7	$\ln k'_{10}$	7.35	0.45
	$E_{ak'1/R}$	5032	150
	$K_I$	-0.39	0.32
	$K_{MG}$	7.35	0.45
8	$\ln k'_{10}$	7.82	0.54
	$E_{ak'1/R}$	5194	184
	$\ln k_{d0}$	104	274
	$E_{akd/R}$	38668	96710
	$K_I$	-0.32	0.31
	$K_{MG}$	18.27	1.66

**Tabla 6.22.** Valores estadísticos de cada modelo propuesto de la reacción esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno con cosolvente

Modelo	F- Fisher	$N_{dexp}$	K	SQR	AICc	BIC	RMSE	VE (%)
5	28318	300	6	0.268	-2093	-2106	0.040	99.03
8	21436	300	8	0.030	-2749	-2765	0.205	99.05

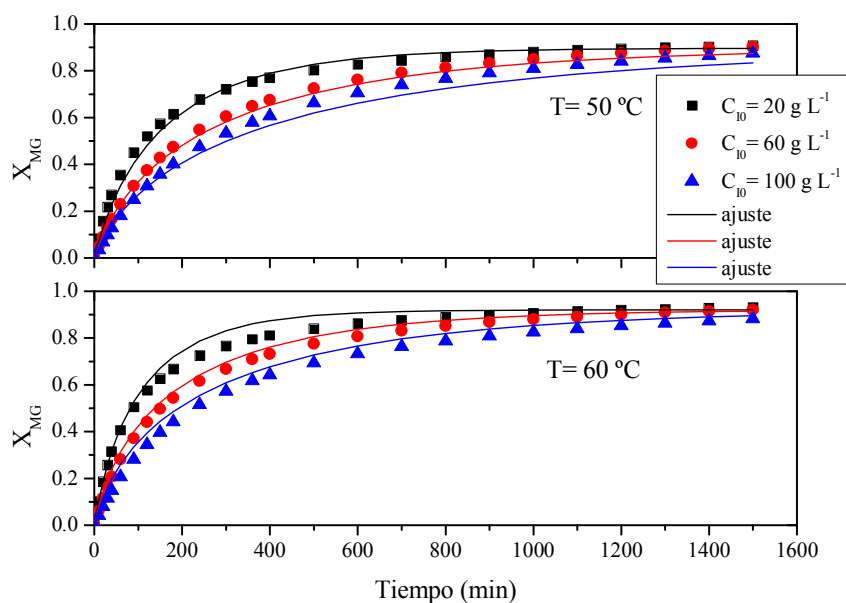


**Figura 6.15.** Error relativo versus la conversión del sistema con agua para el Modelo 5 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster sin desactivación química.

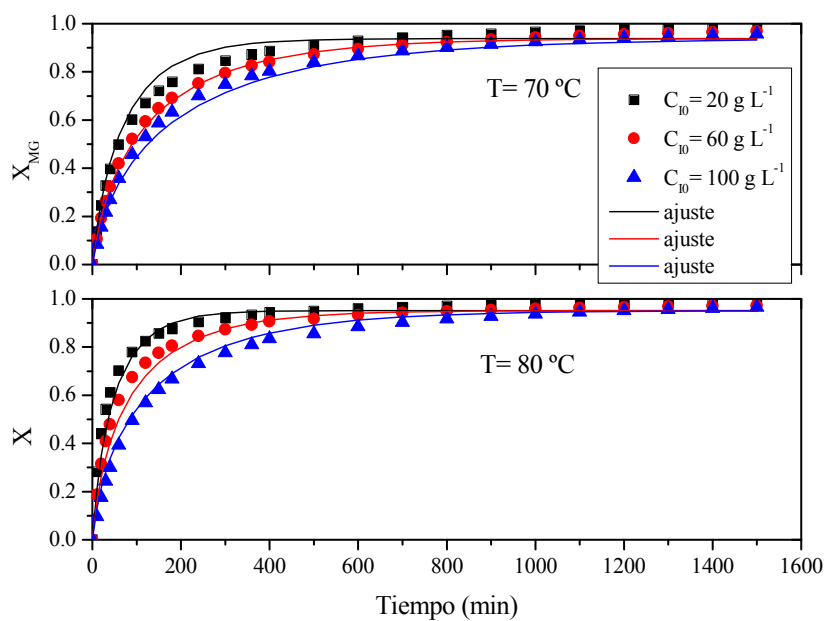
De acuerdo a lo anteriormente mencionado, el mejor modelo de los propuestos para el sistema con agua, es el modelo 5, el cual sugiere un modelo hiperbólico reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y concentración de monoéster, sin desactivación, que queda representado por la ecuación [6.5].

$$r = \frac{\exp\left(6,69 \pm 0,38 - \frac{4766 \pm 129}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot C_I - \exp\left(6,69 \pm 0,38 - \frac{4766 \pm 129}{T}\right) \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}}{1 + (1,55 \pm 0,31) \cdot C_I + (14,70 \pm 0,98) \cdot C_{MG}} \quad [6.5]$$

En las Figuras 6.16 y 6.17 se presenta la reproducción de los datos experimentales por dicho modelo 5, para el sistema con agua añadida, a todas las concentraciones y temperaturas estudiadas. Como se puede apreciar, con el modelo propuesto los ajustes son bastante buenos, aunque se observan ciertas desviaciones en el intervalo de 100 a 600 min, para una concentración de ibuprofeno de 20 g·L<sup>-1</sup> a una temperatura de 60 y 70 °C; de igual manera, para una concentración de ibuprofeno de 100 g·L<sup>-1</sup> y temperaturas de 50 y 60 °C, la bondad del ajuste es muy buena a tiempos cortos, sin embargo, a tiempos mayores de 200 min se presentan ciertas desviaciones con respecto a los datos experimentales, aunque siempre pequeñas.



**Figura 6.16.** Ajuste del Modelo5 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster sin desactivación química total para el sistema con agua a 50 y 60 °C



**Figura 6.17.** Ajuste del Modelo 5 hiperbólico reversible pseudo-orden 1 para el ibuprofeno y monoéster sin desactivación química total para el sistema con agua a 70 y 80 °C

Comparando los valores de los parámetros cinéticos obtenidos en el modelo propuesto en la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la Novozym 435 en presencia de un cosolvente para el sistema anhidro y con agua, se puede apreciar (ver Tabla 6.23) que, para el sistema con agua (modelo 5), las energías de activación ( $E_a$ ) de la reacción directa e inversa presentan un aumento con respecto al sistema anhidro. Por tanto, la adición de agua mejora la transferencia del ibuprofeno, lo cual se refleja en el mayor valor del factor de efectividad en presencia de agua (se pasa de 0,1-0,2 a 0,5-0,6), o sea, de un régimen puramente controlado por transferencia de materia a un régimen de control mixto. También los valores de las energías de activación para la constante cinética de la reacción directa y para la de la reacción inversa son mayores cuando hay agua añadida al medio de reacción. Otro efecto de la adición de agua es la menor tendencia que tienen el ibuprofeno y el monoglicérido a adsorberse sobre la enzima, aparentemente, lo que implica que su disolución en el medio líquido está favorecida por la presencia de agua. El efecto más importante, sin embargo, es la ausencia de desactivación térmica o química cuando se añade agua en las condiciones de temperatura y concentración de ibuprofeno en las que se opera: ya no se precisa considerar una ecuación de desactivación en el modelo cinético; es decir, el agua estabiliza la enzima y se pueden alcanzar valores altos de conversión a monoglicérido incluso a temperatura moderadamente altas (80 °C).

Ahora bien, comparando los resultados de la esterificación de glicerina con ibuprofeno en presencia de un cosolvente (tolueno) usando el preparado Novozym 435 con los resultados obtenidos cuando se usa la enzima libre CALB-L (Capítulo 4 de esta Memoria), se puede observar, en la Tabla 6.23, que los valores de energía de activación de las constantes cinéticas con la enzima CALB-L son más altos que con la Novozym 435, sugiriendo una ausencia total de limitación por transferencia de materia en el caso de la enzima libre y un régimen mixto, en el mejor de los casos, para la enzima inmovilizada. Por otra parte, como se observa en el caso de los sistemas en ausencia de cosolvente, la enzima inmovilizada presenta una menor actividad específica que la enzima libre: solo hay que considerar que se utilizan  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en el caso de la enzima libre y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para los experimentos con el preparado inmovilizado, con productividades específicas de  $0,486 \text{ g MG}\cdot\text{g E}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para la Lipozyme CALB L y de  $0,0234 \text{ g MG}\cdot\text{g E}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para el inmovilizado industrial Novozym 435.

**Tabla 6.23.** Parámetros cinéticos de los modelos determinados para la esterificación de glicerina con ibuprofeno con cosolvente

Enzima	Sistema	$\ln k'_{10}$	$Ea_{k'1}/R$	$\ln k'_{20}$	$Ea_{k'2}/R$	$\ln k_{d0}$	$Ea_{kd}/R$	$K_I$	$K_{MG}$
Novozym 435	0 % v/v	4.57	3888	-3.94	1296	72.86	27207	9.90	44.36
	7.4 % v/v	6.69	4766	-5.00	1689	-	-	1.55	14.70
CALB-L	A	15.16	6812	-	-	-	-	0.68	-
	B	11.42	5274	2.30	2468	-	-	0.86	16.92



### 6.3.- REFERENCIAS CITADAS

- Biard, P.-F. y A. Couvert (2013). Overview of mass transfer enhancement factor determination for acidic and basic compounds absorption in water. *Chemical Engineering Journal* **222** (1): 444-453.
- Cheng, N.-S. (2008). Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **47** (9): 3285-3288.
- Faber, K. (2011). Biotransformations in organic chemistry: a textbook. Springer Science & Business Media.
- Gonzalo, C. (2003). Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéuticos. *Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo*.
- Hasan, N. y B. Farouk (2013). Mass transfer enhancement in supercritical fluid extraction by acoustic waves. *The Journal of Supercritical Fluids* **80** (0): 60-70.
- Idris, A. y A. Bukhari (2012). Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances* **30** (3): 550-563.
- Jeon, S. J., A. Pawelski, M. Kraume y W. H. Hong (2011). Mass transfer enhancement by the alkaline hydrolysis of ethyl acetate in a single droplet system. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **17** (4): 782-787.
- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241-246.
- Kobayashi, T., T. Matsuo, Y. Kimura y S. Adachi (2008). Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85** (11): 1041-1044.
- Ladero, M., A. Santos y F. Garcia-Ochoa (2007). Hindered diffusion of proteins and polymethacrylates in controlled-pore glass: An experimental approach. *Chemical engineering science* **62** (3): 666-678.
- Lu, J.-G., Y.-F. Zheng, M.-D. Cheng y L.-J. Wang (2007). Effects of activators on mass-transfer enhancement in a hollow fiber contactor using activated alkanolamine solutions. *Journal of Membrane Science* **289** (1–2): 138-149.
- Lue, B. M., S. Karboune, F. K. Yeboah y S. Kermasha (2005). Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. *Journal of chemical technology and biotechnology* **80** (4): 462-468.
- Morrone, R., N. D'Antona, D. Lambusta y G. Nicolosi (2010). Biocatalyzed irreversible esterification in the preparation of S-naproxen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65** (1–4): 49-51.
- Morrone, R., G. Nicolosi, A. Patti y M. Piattelli (1995). Resolution of racemic flurbiprofen by lipase-mediated esterification in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (7): 1773-1778.
- Painmanakul, P., K. Loubière, G. Hébrard, M. Mietton-Peuchot y M. Roustan (2005). Effect of surfactants on liquid-side mass transfer coefficients. *Chemical Engineering Science* **60** (22): 6480-6491.
- Poojari, Y. y S. J. Clarson (2013). Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2** (1): 7-11.
- Porrás-Parral, G., T. Miri, S. Bakalis y P. Fryer (2011). The effect of electrical processing on mass transfer and mechanical properties of food materials. *Procedia Food Science* **1** (0): 76-80.

- Reay, D., C. Ramshaw y A. Harvey (2013). Chapter 3 - The Mechanisms Involved in Process Intensification. *Process Intensification* (Second edition). Oxford, Butterworth-Heinemann. 57-90.
- Reay, D. C. R. y A. H. (2013). Chapter 3 - The Mechanisms Involved in Process Intensification". *Process Intensification* (Second edition). Oxford, Butterworth-Heinemann 57-90.
- Ruthiya, K. C., J. van der Schaaf, B. F. M. Kuster y J. C. Schouten (2003). Mechanisms of physical and reaction enhancement of mass transfer in a gas inducing stirred slurry reactor. *Chemical Engineering Journal* **96** (1-3): 55-69.
- Tamayo, J. (2014). Producción enzimática de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácido benzoico y  $\alpha$ -metoxicinámico. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Tamayo, J. J., M. Ladero, V. E. Santos y F. Garcia-Ochoa (2012). Esterification of benzoic acid and glycerol to alpha-monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry* **47** (2): 243-250.
- Thomas, A. M. y R. Narayanan (2002). A comparison between the enhanced mass transfer in boundary and pressure driven oscillatory flow. *International Journal of Heat and Mass Transfer* **45** (19): 4057-4062.
- Wong, C. (1989). Enzymatic catalysts in organic synthesis. *Science* **244** (4909): 1145-1152.

---

***Capítulo 7***  
**RESUMEN Y CONCLUSIONES**

---



## 7.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

### 7.1.- RESUMEN

La escasez y agotamiento de fuentes de energías fósiles tradicionales, así como su influencia negativa sobre el medio ambiente por su impacto en el denominado cambio climático ha llevado a tomar medidas, como la firma del Protocolo de Kyoto, en 1997, que constituye el establecimiento de políticas y marco regulatorio en el mundo para el fomento de uso de energías renovables o la Cumbre sobre el Clima (Paris, 2015) que se está celebrando al mismo tiempo que se escribe esta Memoria. Por esta razón, entre las energías renovables, los biocarburantes han sido una alternativa para luchar contra la insuficiencia y la dependencia energética. En concreto, en los últimos años, la producción de biodiesel se ha incrementado y, con ello, la producción de glicerina, por ser un subproducto de la síntesis del biodiesel. Como consecuencia, el precio de la glicerina se ha reducido durante los últimos años; por lo que los mercados tradicionales de la glicerina (industria cosmética, farmacéutica y alimentaria) no constituyen una demanda suficiente para frenar esta caída. En la actualidad, se están buscando nuevos usos de la glicerina ya sea para uso directo o como materia prima o *building block* para obtener otros productos químicos.

Entre las reacciones de síntesis, la esterificación de la glicerina es una de las vías más utilizadas para su transformación. Por tanto, los esteres de glicerina, monoglicéridos diglicéridos y triglicéridos, obtenidos mediante la esterificación de glicerina con ácidos carboxílicos, son usados como aditivos alimentarios, disolventes, emulsionantes, antioxidantes, y en otras muchas aplicaciones. La esterificación puede llevarse a cabo térmicamente o usando catalizadores homogéneos o heterogéneos, convencionales o enzimáticos.

Este trabajo se centra en el estudio de la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno (antiinflamatorio no esteroideo, AINE) utilizando lipasas como catalizadores de la reacción, en concreto, la lipasa B de *Candida antarctica* en su forma libre e inmovilizada, en un medio libre y en presencia de un cosolvente, para obtener monoglicéridos de ibuprofeno, producto con aplicaciones interesantes en la industria farmacéutica. En este contexto, los ésteres de AINE (profármacos) han surgido como una alternativa para minimizar el efecto adverso de úlceras gastrointestinales causado por el uso crónico por vía oral. En la actualidad, los profármacos han sido usados como

suspensiones, emulsiones, microemulsiones y nanoemulsiones; por ejemplo, gel de dexibuprofeno, derivados transdérmicos de ketoprofeno, etc.

En primer lugar, se ha establecido un procedimiento de trabajo para la realización de la experimentación de manera reproducible. Así, los experimentos de síntesis de monoéster de ibuprofeno se llevaron a cabo en forma discontinua en una instalación que consta de un reactor agitado magnéticamente, operando a temperatura constante, con un medidor asociado a un control de temperatura (PID), el cual actúa sobre el baño termostático de glicerina en el que se sumerge el reactor. Las muestras tomadas a lo largo del experimento se depositan en un Eppendorf y son congeladas con la finalidad de parar la acción de la enzima.

Se han desarrollado y empleado diversas técnicas analíticas, en función del objetivo del análisis. Así, en la determinación de la solubilidad de la mezcla ibuprofeno-glicerina e ibuprofeno-tolueno-glicerina se hizo por espectroscopia de resonancia magnética de protón ( $^1\text{H}$  NMR) a desplazamientos químicos de  $\delta=0,85$  ppm,  $\delta=4,4$  ppm y  $\delta=2.32$  ppm, para ibuprofeno, glicerina y tolueno, respectivamente.

Las muestras recogidas a lo largo de los experimentos de esterificación, se han sometido a un análisis por cromatografía líquida (HPLC) en fase reversa. Se ha utilizado una columna “Mediterránea Sea” C-18 de Teknokroma 25x0.46 cm, con una fase móvil formada por 83% metanol-17% agua acidificada (los eluyentes utilizados son agua mili-Q acidificada con ácido sulfúrico hasta un pH 2,2 y metanol de elevada pureza). La temperatura de la columna se mantuvo en 30°C y el caudal del eluyente empleado fue de 0,8 mL/min. La respuesta de absorbancia se midió a una longitud de onda de 254 nm del detector “diode-array” del que dispone el equipo. Para cuantificar los datos, se utilizó la suma de las áreas del ibuprofeno y del monoéster de ibuprofeno, es decir, se asume la misma respuesta para los dos compuestos. De esta manera, el área de pico de cada compuesto es el valor que se utiliza para calcular su conversión.

La caracterización de la suspensión-emulsión, la mezcla de ibuprofeno y glicerina a la que se añade el preparado enzimático CALB-L, se realizó empleando la técnica de FBRM para caracterizar gotas de gran tamaño (1-1000 $\mu\text{m}$ ) y por espectrofotometría de luz ultravioleta-visible a 600 nm de longitud de onda. Las gotas más pequeñas fueron analizadas por la técnica láser de luz dinámica dispersa (DLS). La identificación y cuantificación del producto formado durante la esterificación enzimática de glicerina con

ibuprofeno, se ha hecho por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas. Para el estudio de la estructura de Novozym 435, el inmovilizado comercial de CALB, se han obtenido las isothermas BET con nitrógeno y se ha empleado la microscopía electrónica de barrido (SEM).

En la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima CALB, se han planteado los siguientes sistemas de reacción:

- **Sistema 1:** Producción de monoéster de ibuprofeno por esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa CALB en su forma libre sin disolvente. Este sistema se caracteriza por tener la enzima en disolución (biocatalizador homogéneo), se considera un sistema bifásico L-S, donde la fase líquida L está formada por la glicerina y la enzima libre CALB-L, mientras que la fase sólida S es ibuprofeno, que se va a disolviendo.
- **Sistema 2:** Producción de monoéster de ibuprofeno por esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa CALB en su forma libre, en presencia de un disolvente (tolueno). Es un sistema bifásico ( $L_1$ - $L_2$ ), donde la fase  $L_1$  está formada por la glicerina y la enzima CALB-L, mientras la fase  $L_2$  se encuentra el ibuprofeno disuelto en el cosolvente.
- **Sistema 3:** Producción de monoéster de ibuprofeno por esterificación de la glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa inmovilizada Novozym 435 en un medio libre de disolvente. Es un sistema bifásico (L-S), donde L está formada por el ibuprofeno disuelto en la glicerina, mientras S es la fase formada por la enzima inmovilizada CALB (Novozym 435). No obstante, puede existir otra fase sólida formada por el ibuprofeno no disuelto en la glicerina, lo que supondría un sistema trifásico, a temperaturas moderadas de reacción.
- **Sistema 4:** Producción de monoéster de ibuprofeno por esterificación de la glicerina con ibuprofeno catalizada por la lipasa inmovilizada Novozym 435 en presencia de un cosolvente (tolueno). Por tanto, es un sistema trifásico ( $L_1$ - $L_2$ -S), donde  $L_1$  está formada por el ibuprofeno disuelto en tolueno y  $L_2$  es la fase de glicerina, mientras S es la fase constituida por la enzima inmovilizada.

En consecuencia, en cada uno de los sistemas propuestos se han planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de las variables que pueden afectar la estabilidad del biocatalizador en su forma libre e inmovilizada y, por ende, su efecto en la reacción de esterificación de glicerina e ibuprofeno.
2. Proponer varios modelos cinéticos para describir los resultados experimentales obtenidos en cada uno de los sistemas citados.
3. Seleccionar el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales utilizando criterios físicos y estadísticos.

De esta manera, en el Sistema 1 se han realizado una serie de experimentos previos analizando el efecto de las siguientes variables sobre la reacción de esterificación: solubilidad de ibuprofeno en glicerina, efecto de la concentración de enzima, influencia de la velocidad de agitación, posible desactivación enzimática e inhibición por sustrato y producto.

Inicialmente, se ha determinado la solubilidad del ibuprofeno en la glicerina, luego se han realizado diversos experimentos de esterificación de glicerina con ibuprofeno variando la concentración del preparado comercial CALB-L, entre 0,7 y 2,7 g·L<sup>-1</sup>, a una temperatura fija de 70 °C, una concentración inicial de ibuprofeno de 60 g·L<sup>-1</sup> y velocidad de agitación de 720 rpm.

De forma similar, se ha estudiado la velocidad de agitación, variándola en el intervalo de 120 a 1200 rpm, dejando fija la temperatura, en 80 °C, la concentración inicial de ibuprofeno, 100 g·L<sup>-1</sup>, y la concentración de enzima CALB-L en 2 g·L<sup>-1</sup>.

La inhibición por agua, un producto de la esterificación de glicerina e ibuprofeno, se ha estudiado añadiendo agua a la mezcla inicial de reacción, en el intervalo de 6 a 15 %v/v, empleando distintas velocidades de agitación (240, 480 y 720 rpm), una temperatura fija de 80 °C, una concentración inicial de ibuprofeno de 100 g·L<sup>-1</sup>, y con una concentración de enzima de 2 g·L<sup>-1</sup>.

Para comprobar el posible efecto inhibitor de los reactivos, se han realizado diferentes experimentos variando la cantidad inicial de ibuprofeno entre 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>.

Para estudiar la posible desactivación por temperatura se ha cambiado esta variable entre 50 y 80 °C, manteniendo constante la concentración de enzima CALB-L (2



$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el volumen de glicerina (20 mL). De esta forma, se han establecido las siguientes condiciones de operación: un sistema donde el agua proviene del preparado de la enzima comercial (6% v/v de agua), y otro el que se añade agua hasta el 10 %v/v. Ambos sistemas se han estudiado en un intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, una concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , una concentración de enzima de 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y una velocidad de agitación de 720 rpm. Además, se ha determinado la conversión final dejando que la reacción de esterificación transcurra o progrese durante tres días (72 h), alcanzando valores del 0,92 al 0,98, para comprobar la reversibilidad de la reacción de esterificación.

En la propuesta del modelo cinético, se ha considerado el mecanismo “Ping-Pong Bi-Bi” sin inhibición por productos o sustrato, ampliamente usado en reacciones de esterificación o transesterificación catalizadas por lipasas. En el caso en estudio, la concentración de glicerina es mucho mayor que la concentración inicial de ibuprofeno ( $C_{\text{gli}} \gg C_{\text{ibu}}$ ) por estar la glicerina en un gran exceso, por lo que su concentración se ha considerado constante a lo largo de los experimentos; de igual manera, la concentración de agua es mayor que la concentración del monoéster de ibuprofeno ( $C_{\text{agua}} \gg C_{\text{éster}}$ ), por tanto se ha considerado también constante con el tiempo la concentración del agua, por lo que el modelo del mecanismo de “Ping-Pong Bi-Bi” queda expresado de forma más simple y muy próxima al tipo Michaelis-Menten con un solo sustrato y producto sin inhibición por sustrato o producto. Así, los modelos propuestos para el Sistema 1 han sido los siguientes:

Descripción	Ecuación cinética
<b>Modelo 1</b> Potencial reversible donde la $K_I$ y $K_{MG}$ son despreciable	$r = k_1' \cdot C_I - k_2' \cdot C_{MG}$
<b>Modelo 2</b> Hiperbólico reversible de orden cero con respecto a la concentración de ibuprofeno	$r = \frac{k_1' - k_2' \cdot C_{MG}}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
<b>Modelo 3</b> Hiperbólico reversible tipo Michaelis-Menten sin desactivación	$r = \frac{k_1' \cdot C_I - k_2' \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$

En el ajuste de los modelos cinéticos propuestos a los datos obtenidos, se ha aplicado el algoritmo de Runge-Kutta de cuarto orden y el algoritmo de Marquardt-Levenberg, ambos se han aplicado usando el software Aspen Custom Modeler v.7.3. En primer lugar, se ha ajustado cada modelo a los datos experimento a experimento, con la

finalidad de estimar constantes cinéticas y constantes de Michaelis-Menten, además de su evaluación en cuanto al sentido físico y estadístico de cada modelo cinético. Después, se han ajustado los modelos a todos los datos experimentales incluyendo los obtenidos a diferentes temperaturas y concentraciones iniciales de ibuprofeno. Para la discriminación y selección del modelo más adecuado, se han considerados criterios físicos tradicionales junto con criterios estadísticos representativos: error estándar (RMSE), parámetro F de Fisher (F95), suma de residuos al cuadrado (SQR), criterio de Akaike corregido (AICc), criterio Bayesiano de información (BIC) y porcentaje de variación explicativa (%VE).

Siguiendo la misma metodología aplicada en el Sistema 1, en el Sistema 2 se han realizado una serie de experimentos previos para estudiar la influencia de las siguientes variables en la reacción de esterificación: selección del cosolvente y solubilidad del ibuprofeno en dicho cosolvente, influencias de la concentración de enzima, de la velocidad de agitación, de la posible desactivación e inhibición por sustrato y producto. Se han probado diferentes disolventes para disolver el ibuprofeno en cantidad suficiente y ser usados como medio orgánico (cosolvente) en la esterificación enzimática de la glicerina con el ibuprofeno; para ello, se ha determinado la solubilidad del ibuprofeno en los siguientes disolventes: 2-butanol, 2-butanona, 1,4 dioxano, tert-butilalcohol, tetradecano, tolueno y xileno. De todos los disolventes probados, el tolueno es el que mejor disuelve al ibuprofeno y se ha seleccionado como cosolvente. Luego, se ha determinado la solubilidad de ibuprofeno en tolueno en el intervalo de concentraciones iniciales de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup> y temperaturas entre 50 y 80 °C.

Para el estudio de la influencia de la concentración de enzima en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno se han hecho una serie de experimento considerando unas condiciones de concentración de enzima, velocidad de agitación y concentración de ibuprofeno muy similares a las empleadas en el estudio del Sistema 1; en todos ellos, se ha empleado una relación volumétrica glicerina-tolueno 20/5.

De igual manera, se ha hecho con la velocidad de agitación variándola en el intervalo de 120 a 960 rpm, dejando fijas la temperatura, en 80 °C, la concentración inicial de ibuprofeno, en 100 g·L<sup>-1</sup> y la concentración de enzima CALB-L, en 2 g·L<sup>-1</sup>. Ahora se ha experimentado con diferentes relaciones en volumen glicerina/tolueno: 1/20; 10/10 y 20/5, aunque, como el caso se anterior, se mantiene fija la temperatura (80 °C), la

concentración inicial de ibuprofeno ( $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), la concentración de enzima ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y la velocidad de agitación (720 rpm).

El posible efecto inhibidor del reactivo (ibuprofeno) y la posible desactivación de la enzima en la esterificación del ibuprofeno con la glicerina en medio orgánico se ha estudiado considerando el mismo intervalo de operación que en el Sistema 1 en cuanto a la concentración inicial de ibuprofeno y la temperatura, manteniendo en todas las experimentaciones constantes la concentración de enzima CALB-L ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y la relación Gli/Tol en 20/5. En el estudio de la inhibición por agua, se han empleado las mismas condiciones del Sistema 1 con la variante de la presencia de una relación de glicerina-tolueno de 20/5. Al observarse que el tolueno (cosolvente) se evapora durante los experimentos de esterificación, pudiendo arrastrar agua que se vaya formando y, por tanto, pudiéndose desplazar el equilibrio de la reacción de esterificación, se han llevado a cabo experimentos tanto en un reactor abierto (A) como en uno cerrado (B). En ambos casos, las condiciones de operación han sido las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, una concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , una relación en volumen de glicerina y tolueno (Gli/Tol) de 20/5, una concentración de enzima de  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , una concentración de agua de 6,4 % v/v y una velocidad de agitación de 720 rpm. Además, se ha determinado la conversión final en el sistema abierto (A) y en el sistema cerrado (B), dejando que la reacción de esterificación transcurra o progrese durante tres días (72 h), en el sistema abierto (A) la conversión final fue prácticamente 1, mientras que, en el sistema cerrado (B) la conversión de equilibrio varía de 0,6 a 0,8 según la temperatura aumenta de 50 a 80 °C.

Como se ha explicado en el caso del Sistema 1, se han propuesto diferentes modelos cinéticos, realizándose el ajuste a los datos experimentales usando el software Aspen Custom Modeler v.7.3, y aplicando los criterios físicos y estadísticos ya mencionados, para seleccionar el modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales. Los modelos propuestos para el Sistema 2 han sido los siguientes:

Sistema	Descripción	Ecuación cinética
A	<b>Modelo 1</b> Potencial de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno	$r = k'_1 \cdot C_I$
	<b>Modelo 2</b> Tipo Michaelis-Menten irreversible sin inhibición por sustrato	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I}$
	<b>Modelo 3</b> Hiperbólico irreversible se desprecia los efectos de la concentración de ibuprofeno.	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
B	<b>Modelo 4</b> Potencial reversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y monoéster de ibuprofeno	$r = k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}$
	<b>Modelo 5</b> Hiperbólico reversible se considera el efecto solo del monoéster de ibuprofeno	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
	<b>Modelo 6</b> Hiperbólico reversible se considera solo el efecto de la concentración de ibuprofeno	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I}$
	<b>Modelo 7</b> Tipo Michaelis- Menten	$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$

A continuación, se ha estudiado la aplicación de un biocatalizador heterogéneo (preparado enzimático Novozym 435) en la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno en ausencia y en presencia de un cosolvente. El Sistema 3 se refiere al uso de la Novozym 435 sin disolvente. De forma muy similar a lo hecho en los Sistemas 1 y 2, en este Sistema 3 se han realizado una serie de experimentos previos, analizando el efecto de las siguientes variables en la velocidad del proceso global de esterificación: la concentración de enzima, la velocidad de agitación, la posible desactivación e inhibición por sustrato y producto. Además, se ha evaluado la influencia de las posibles limitaciones al transporte de materia externo e interno.

En este caso, para este sistema, en la esterificación enzimática de glicerina con ibuprofeno se ha estudiado el efecto de la concentración de enzima variando su valor entre 10 y 40 g·L<sup>-1</sup>, para una concentración inicial de ibuprofeno de 60 g·L<sup>-1</sup>, una temperatura de 70 °C, una velocidad de agitación de 720 rpm y una concentración de agua de 0 %v/v.

Para comprobar la existencia de posibles limitaciones al transporte de materia externo se ha estudiado el efecto de la velocidad de agitación a dos temperaturas: 50 °C y 80 °C, variando la agitación entre 120 y 840 rpm, con una concentración inicial de

ibuprofeno de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , una concentración de enzima de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y sin adición de agua ( $C_w=0 \text{ \%v/v}$ ). Además de obtener los datos experimentales a diferentes velocidades de agitación, se ha aplicado el criterio de Mears para comprobar la posible existencia de limitaciones al transporte de materia externa.

Para estudiar la influencia de la transferencia de materia interna, en los poros del soporte, en la velocidad global del proceso, se ha experimentado con diferentes tamaños de partícula del biocatalizador. Para ello, se ha obtenido distintos tamaños de partícula del preparado inmovilizado comercial tamizando dicho preparado, para obtener fracciones de tamaño de partícula entre 0,32-0,5; 0,5-0,7 y 0,7-1 mm. Se han realizado experimentos con cada una de estas fracciones, fijando las siguientes condiciones: una concentración inicial de ibuprofeno de  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , una temperatura de 50 y 70 °C, una concentración de enzima de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , una velocidad de agitación de 720 rpm y sin añadir agua ( $C_w=0 \text{ \% v/v}$ ). De esta manera, para comprobar la posible existencia de limitaciones por difusión interna determinada experimentalmente, se ha determinado el factor de efectividad ( $\eta$ ) planteando un sistema de ecuaciones para cada una de las fracciones considerada mediante la ecuación [7.1] y calculando el valor medio mediante la ecuación [7.2]. Se ha tratado de corroborar los resultados obtenidos aplicando el criterio de Weiz-Prater.

$$\frac{\eta_i}{\eta_j} = \frac{r_{\text{obs},i}}{r_{\text{obs},j}} \quad i = 1, 2; j = 2, 3, 1 \quad [7.1]$$

$$\bar{\eta} = \sum_{i=1}^n x_i \cdot \eta_i \quad [7.2]$$

donde:  $i, j$  son los valores correspondiente a cada una de las fracciones de tamaño de partícula,  $\bar{\eta}$  es el factor de efectividad de la fracción media,  $x_i$  es porcentaje en masa de cada una de las fracciones de tamaño de partícula.

La posible inhibición del reactivo (ibuprofeno) en la esterificación enzimática de glicerina se ha estudiado considerando las mismas condiciones de operación empleadas en los Sistemas 1 y 2; para el estudio de la posible desactivación de la enzima se usó el mismo intervalo de temperatura, de 50 a 80 °C, empleado en sistemas anteriores, pero en este caso se ha mantenido constante la concentración de enzima Novozym 435 ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Mientras que, la inhibición por agua se ha estudiado añadiendo agua en el medio en el mismo intervalo que se consideró para el Sistema 1 con la enzima libre CALB-L, es decir, una adición de agua entre 0 y 16,7 % v/v, utilizando las mismas condiciones de temperatura, velocidad de agitación y concentración inicial de ibuprofeno de los sistemas anteriormente considerados.

De acuerdo a los experimentos previos, las condiciones de operación elegidas para llevar a cabo los experimentos cinéticos son las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, concentración de enzima de 30 g·L<sup>-1</sup>, velocidad de agitación de 720 rpm y concentración de agua de 0 % v/v (sistema 3 anhidro).

En este caso, la reacción de esterificación se ha llevado a cabo con un exceso de glicerina con respecto a la concentración inicial de ibuprofeno ( $C_{\text{glicerina}} \gg C_{\text{ibuprofeno}}$ ), como en los sistemas anteriormente mencionados y, se ha supuesto que la concentración de los productos de la reacción de esterificación son iguales ( $C_{\text{agua}} = C_{\text{éster}}$ ). Además, se ha supuesto que no hay inhibición por parte del monoéster de ibuprofeno y, del estudio de la influencia de las limitaciones por transferencia de materia interna, el factor de efectividad ( $\eta$ ) a considerar en los modelos cinéticos es de, aproximadamente, 0,11 correspondiente al valor medio calculado para el preparado comercial formado por diversas fracciones de tamaños de partículas. De acuerdo a los experimentos previos, el preparado enzimático Novozym 435 es desactivado por efecto de la concentración del ácido (ibuprofeno) y temperatura. En este sentido, se ha propuesto un mecanismo de desactivación total irreversible, siendo la velocidad de desactivación proporcional a la concentración de ibuprofeno y a la actividad remanente ( $a_R$ ). Por tanto, se han propuesto los siguientes modelos cinéticos para el Sistema 3 anhidro:

Descripción	Ecuación cinética
<b>Modelo 1</b> Hiperbólico reversible sin desactivación química total	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$
<b>Modelo 2</b> Hiperbólico reversible con desactivación química total	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
<b>Modelo 3</b> Sigmoidal reversible con desactivación química total	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - k_2' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_{IR}}$ $S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG}$ $\text{Si } C_I \geq S_{IR} \Rightarrow C_{IR} = S_{IR}$ $\text{Si } C_I < S_{IR} \Rightarrow C_{IR} = C_I$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$

Como en casos anteriores, se ha realizado el ajuste a los datos experimentales usando el software Aspen Custom Modeler v.7.3 y, aplicando los criterios físicos y

estadísticos ya mencionados, se ha elegido de los tres modelos cinéticos propuestos el que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Adicionalmente, como resultado de los experimentos llevados a cabo en el estudio de la reacción de esterificación de glicerina con ibuprofeno en el Sistema 3, añadiendo una cierta concentración de agua, se ha decidido evaluar el efecto de la presencia del agua en la velocidad de reacción, en la velocidad de transferencia de materia, y sobre la desactivación enzimática; es decir, su influencia en la velocidad global del proceso. De igual manera que en el Sistema 3 anhidro, en el Sistema 3 con una concentración de agua añadida hasta el 16,7 % v/v, se han empleado las mismas condiciones de operación que en el Sistema 3 sin añadir agua (anhidro), es decir, temperaturas de 50 °C y 80 °C y velocidad de agitación entre 120 y 840 rpm. Además, como en casos anteriores, se ha calculado el módulo de Mears para poner de manifiesto si existen limitaciones debidas al transporte externo de materia.

En el estudio de la influencia de la transferencia de materia interna en la velocidad global del proceso, se ha experimentado con las mismas fracciones de tamaño de partícula del biocatalizador del Sistema 3 anhidro y, se han considerado las mismas condiciones de operación establecidas en este sistema. Así, para comprobar la posible existencia de limitaciones por difusión interna determinada experimentalmente, se ha determinado el factor de efectividad ( $\eta$ ) usando el mismo procedimiento planteado en el sistema anterior, y se ha calculado el módulo de Weiz-Prater para comprobar qué predice este criterio en cuanto a las limitaciones al transporte interno de materia interno.

De acuerdo con los experimentos previos, las condiciones de operación empleadas para los experimentos que tienen como objeto determinar un modelo cinético fueron las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, intervalo de concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, velocidad de agitación de 720 rpm, concentración de agua de 16,7 % v/v y concentración de enzima fija en 30 g·L<sup>-1</sup>, este valor se determinó como adecuado previamente, en el caso del sistema anhidro, sin adición de agua.

En la selección del modelo cinético más adecuado, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales, discriminando entre ellos considerando criterios físicos y estadísticos de una forma similar a lo hecho para los sistemas anteriores. Así, los modelos propuestos son iguales a los definidos para el Sistema 3 anhidro, considerando un factor de efectividad ( $\eta$ ) de, aproximadamente, 0,11

correspondiente al valor medio de las diferentes fracciones de tamaños de partículas presentes en el preparado enzimático Novozym 435.

Finalmente, para el estudio de la esterificación de glicerina con ibuprofeno catalizada por la enzima inmovilizada Novozym 435 con cosolvente (Sistema 4), se han realizado una serie de experimentos previos para estudiar el efecto de las siguientes variables en la velocidad global de esterificación: concentración de enzima, velocidad de agitación, relación glicerina-cosolvente, desactivación e inhibición por sustrato y producto. También, se ha estudiado la influencia de las posibles limitaciones al transporte de materia externo e interno. Como en casos anteriores, el tolueno fue elegido como cosolvente, de acuerdo a la experimentación previa realizada para el sistema 2.

En los experimentos previos realizados, se ha utilizado la misma concentración de enzima que en el Sistema 1, es decir, una concentración de enzima  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En cuanto a la relación glicerina-tolueno (Gli/Tol), de la experimentación previa también se obtuvo la misma relación Gli/Tol seleccionada en el Sistema 2, 20/5. De forma similar a lo hecho en el Sistema 3, las limitaciones por transferencia externa se han evaluado usando las mismas condiciones de operación del Sistema 3, se ha estudiado experimentalmente la velocidad de esterificación a dos temperaturas: 50 y 80 °C y la velocidad de agitación en el intervalo entre 120 y 840 rpm. De nuevo, se ha calculado el módulo de Mears para verificar si las limitaciones al transporte de materia externa son significativas.

Para estudiar el efecto de la transferencia de materia en el interior de los poros del biocatalizador, se operó de una forma parecida al sistema anterior. La velocidad del proceso se ha medido experimentalmente a dos temperaturas: 50 y 70 °C, utilizando las mismas fracciones de tamaño de partícula consideradas en el Sistema 3 (0,32-0,5; 0,5-0,7 y 0,7-1 mm). El factor de efectividad ( $\eta$ ) se ha calculado para comprobar las limitaciones por difusión interna y, además, el módulo de We-Pt para comprobar la importancia de las limitaciones al transporte interno usando Novozym 435.

La posible inhibición del ibuprofeno, la inhibición por agua y la desactivación de la enzima, para este Sistema 4, se ha evaluado considerando las mismas condiciones de operaciones establecidas en los Sistemas 2 y 3. De acuerdo con los experimentos previos, las condiciones de operación elegidas para el estudio cinético han sido las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , concentración de enzima de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , velocidad de agitación de 720 rpm, relación



en volumen de glicerina-tolueno (Gli/Tol)=20/5 y sin adición de agua (concentración de agua de 0 % v/v).

Para la determinación del modelo cinético, se han aplicado las mismas consideraciones que para los modelos propuestos en el Sistema 3, teniendo en cuenta una desactivación química total y un factor de efectividad de, aproximadamente, 0,14, correspondiente al valor medio de las diversas fracciones de tamaño de partículas de la Novozym 435. Los modelos propuestos para el Sistema 4 sin adición de agua (anhidro) son los que se muestran a continuación:

Descripción	Ecuación cinética
<b>Modelo 1</b> Hiperbólico reversible de pseudo primer orden respecto al ibuprofeno	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
<b>Modelo 2</b> Hiperbólico reversible con desactivación química total	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
<b>Modelo 3</b> Hiperbólico irreversible con desactivación química total	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
<b>Modelo 4</b> Hiperbólico irreversible con desactivación química total y desactivación térmica	$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_{dT} \cdot a_R + k_d \cdot a_R \cdot C_I$

Además, como se ha hecho en el caso del Sistema 3, se ha considerado en este caso evaluar el efecto de añadir una concentración de agua del 7,4 % v/v en la velocidad de transferencia de materia externa e interna y en la desactivación enzimática. En los experimentos se ha mantenido constante la concentración de enzima en 30 g·L<sup>-1</sup>, también la relación Gli/Tol en 20/5; valores considerados adecuados según los resultados experimentación previos en el caso del Sistema 4 sin adición de agua (anhidro).

Siguiendo el mismo procedimiento del Sistema 4 anhidro, las limitaciones por transferencia externa de materia se ha determinado experimentalmente a dos temperaturas: 50 y 80 °C, variando la velocidad de agitación entre 120 y 840 rpm. De nuevo calculando el módulo de Mears para verificar la existencia de limitaciones a la difusión externa.

En cuanto a las limitaciones de transferencia interna se ha evaluado de una manera muy similar al sistema anterior. La velocidad de esterificación se ha medido experimentalmente a dos temperaturas: 50 y 70 °C, utilizando las mismas fracciones de tamaño de partícula consideradas en los sistemas anteriores (Sistema 3 y 4). Comprobándose la resistencia de limitaciones por difusión interna por el cálculo del factor de efectividad ( $\eta$ ) y del módulo de Weisz-Prater cuando se usa la Novozym 435.

La posible inhibición del ibuprofeno y desactivación de la enzima, se ha evaluado en este Sistema 4 con agua añadida, operando bajo las mismas condiciones establecidas en el Sistema 4 anhidro.

En este caso, las condiciones de operación empleadas para los experimentos que tienen como objeto determinar un modelo cinético son las siguientes: intervalo de temperatura de 50 a 80 °C, intervalo de concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, velocidad de agitación de 720 rpm, concentración de agua de 7,4 % v/v, concentración de enzima 30 g·L<sup>-1</sup> y relación Gli/Tol=20/5.

En la selección del modelo cinético más adecuado, se han ajustado los diversos modelos propuestos a los datos experimentales obtenidos, como en caso anteriores, discriminando entre ellos por criterios físicos y estadísticos. Los modelos propuestos en el Sistema 4 con agua consideran que la concentración de glicerina y de agua están en gran exceso con respecto a la concentración de ibuprofeno y monoéster de ibuprofeno ( $C_{\text{Gli}} \gg C_{\text{ibu}}$  y  $C_{\text{agua}} \gg C_{\text{éster}}$ ) y permanecen prácticamente constantes con el tiempo de reacción. Por tanto, se ha considerado que la forma de las ecuaciones de la velocidad de reacción sea muy similares a las propuestas en el caso del Sistema 1. Además, se ha considerado un factor de efectividad ( $\eta$ ) de, aproximadamente, 0,48, mucho mayor que en los sistemas anteriormente considerados. Los modelos cinéticos propuestos para el Sistema 4 con agua se muestran a continuación:

Descripción	Ecuación cinética
<b>Modelo 5</b> Hiperbólico reversible sin desactivación química total	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
<b>Modelo 6</b> Hiperbólico reversible con desactivación química total	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$
<b>Modelo 7</b> Hiperbólico irreversible sin desactivación química total	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$
<b>Modelo 8</b> Hiperbólico irreversible con desactivación química total	$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}}$ $-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I$

## 7.2.- CONCLUSIONES

Como consecuencia del trabajo que se describe en esta Memoria, del análisis de los resultados experimentales y de la interpretación de los mismos, se pueden establecer una serie de conclusiones acerca de la producción del monoéster de ibuprofeno catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*, que a continuación se exponen clasificadas por temas y sistemas estudiados.

### *Sobre los métodos experimentales empleados*

- 1) Se ha establecido un método experimental, que incluye el procedimiento experimental y el empleo de distintas técnicas de análisis, que proporcionan datos experimentales fiables y repetitivos.
  - a. El análisis por HPLC es capaz de analizar cuantitativamente los posibles productos de reacción de forma rápida y sencilla. Se ha comprobado la notable selectividad de la lipasa hacia el monoéster de ibuprofeno, mediante la aplicación de técnicas complementarias como HPLC-MS.
  - b. Mediante el análisis de  $^1\text{H}$  RMN se pudo determinar la solubilidad de la mezcla ibuprofeno-glicerina e ibuprofeno-glicerina-tolueno.
  - c. Las técnicas de análisis por FBRM, espectrofotometría UV-vis y DLS permitieron caracterizar la suspensión-emulsión en cada caso.
- 2) Se ha podido seguir la evolución del número de gotas de la suspensión-emulsión formada cuando se añade la enzima CALB en su forma libre a la mezcla glicerina-ibuprofeno, a diferentes temperaturas de operación, mediante la técnica de FBRM. Así se determinó que el número de gotas y el promedio de longitud de cuerda disminuyen con el tiempo de reacción, y que, a una temperatura de 80 °C, ya no son detectadas. Con la técnica de análisis DLS, se observó un tamaño de gota en el rango nanométrico (0-200 nm) y se puede seguir la evolución de su tamaño con el progreso de la reacción de esterificación.

### *Sobre la solubilidad y miscibilidad de diferentes fases*

- 3) La solubilidad del ibuprofeno en glicerina y en la mezcla glicerina-tolueno presenta las siguientes características:
  - a. La solubilidad del ibuprofeno en glicerina es muy pequeña a bajas temperaturas, pero se incrementa exponencialmente con esta variable.

- b.** Entre los diferentes disolventes estudiados, la máxima solubilidad del ibuprofeno se obtuvo en tolueno, por lo que fue seleccionado como medio orgánico de reacción. Entre 50 a 80 °C de temperatura, la solubilidad del ibuprofeno en tolueno aumenta notablemente.
  - c.** La relación de partición del ibuprofeno ( $K_p$ ) entre el tolueno y la glicerina disminuye a medida que aumenta la temperatura, de 50 a 80 °C, encontrándose el ibuprofeno en mayor concentración en la fase tolueno que en la fase glicerina.
- 4)** Se ha puesto de manifiesto la capacidad emulsificante y disolvente del monoéster de ibuprofeno (monoglicérido): cerca o sobre el punto de fusión del ibuprofeno tiene un papel importante en la suspensión-emulsión, aumentando la solubilidad del ibuprofeno y la dispersión del mismo en la glicerina. Este hecho se ha establecido al observar por FBRM y DLS una distribución bimodal de ibuprofeno en glicerina que depende de la temperatura y del tiempo de reacción. Esta conclusión también se confirma al observar el incremento en la turbidez medida por la técnica de espectrofotometría UV-vis. El aumento de dispersión del ibuprofeno en la glicerina convierte la suspensión en una emulsión de aspecto blanco lechoso a bajas temperaturas, o una microemulsión más clara, de aspecto traslúcido a 70 y 80 °C, a valores elevados de conversión y, en consecuencia, a concentraciones elevadas de monoglicérido.
- 5)** La presencia de una menor o mayor concentración de agua en el medio de reacción, dentro del intervalo estudiado (de 6 a 16,7 % v/v), tiene diferentes efectos según el sistema considerado:
  - a.** La adición de agua en el Sistema 1 (glicerina + ibuprofeno + enzima libre CALB) produce un incremento en la velocidad inicial de esterificación y del rendimiento final a monoéster de ibuprofeno. Añadir agua disminuye la viscosidad de la fase glicerina, mejorando el contacto entre las fases líquidas. Por otra parte, la gran afinidad del glicerol por el agua puede alejarla del centro activo, donde se podría acumular como producto de reacción si no se diera este efecto.
  - b.** Sin embargo, la adición de agua en el caso del Sistema 2 (glicerina + ibuprofeno + enzima libre CALB + tolueno como cosolvente) produce una

disminución en la velocidad inicial de esterificación y del rendimiento final a monoéster de ibuprofeno, lo que puede ser debido a que el agua se acumula en torno a la enzima en estas condiciones.

- c. La influencia de la adición de agua en el Sistema 3 (glicerina + ibuprofeno + enzima inmovilizada Novozym 435) y en el Sistema 4 (glicerina + ibuprofeno + enzima inmovilizada Novozym 435 + tolueno) se manifiesta en una disminución de la viscosidad de la mezcla, lo que favorece el transporte de materia, externo e interno, y tiene una acción también sobre la velocidad de reacción, pero al estar siempre asociado este fenómeno al transporte en los poros del sólido soporte, dicha influencia está ligada primordialmente a los fenómenos de transporte.

***Sobre la reacción de esterificación catalizada por la enzima libre, Lipozyme CALB, en un medio libre de disolvente (Sistema 1)***

- 6) La reacción de esterificación en estas condiciones puede considerarse reversible, aunque con una conversión alta en el equilibrio. Dicha conversión varía con la adición de agua, que varía entre 6 y 10 % v/v, para una concentración inicial de ibuprofeno de 20 a 100 g·L<sup>-1</sup>, y una temperatura de 50 a 80 °C, manteniendo la concentración de enzima en 2 g·L<sup>-1</sup>: se alcanzan valores del 92 al 98 % de conversión a monoéster. En este caso, el sistema está abierto a la atmósfera.
- 7) Se ha determinado un modelo cinético que se ajusta fielmente a los resultados experimentales obtenidos, incluso para distintas concentraciones de agua añadida. El modelo cinético seleccionado está de acuerdo con un mecanismo de Michaelis-Menten de una reacción reversible, incluyendo esterificación e hidrólisis, siendo de pseudo-cero orden respecto a las concentraciones de glicerina y agua, representado por las ecuaciones [7.3] y [7.4], junto a las que están los valores de los parámetros cinéticos y sus intervalos de confianza.

**Modelo cinético con 6 % v/v de agua:**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.3]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 6,71 \pm 2,25 - \frac{4612 \pm 110}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 10,40 \pm 0,33 - \frac{4305 \pm 767}{T} \right]$$

$$K_I = 5,82 \pm 0,57 \quad K_{MG} = 23,03 \pm 1,6$$

#### Modelo cinético con 10 % v/v de agua

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.4]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 15,37 \pm 0,49 - \frac{5891 \pm 151}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 21,79 \pm 4,91 - \frac{9036 \pm 1710}{T} \right]$$

$$K_I = 30,15 \pm 5,81 \quad K_{MG} = 41,51 \pm 8,39$$

- 8) Los valores de las energías de activación son distintas para este sistema con 6 o con 10 %v/v de agua; la energía de activación de la reacción directa aumenta de 37 kJ mol<sup>-1</sup> a 48 kJ mol<sup>-1</sup>, mientras que, para la reacción inversa, varía de 35 kJ mol<sup>-1</sup> a 75 kJ mol<sup>-1</sup>. La presencia de una mayor concentración agua (10 %v/v) aumenta la velocidad de reacción. Este hecho se refleja también en los cambios en los valores de las constantes del denominador de la ecuación cinética,  $K_I$  y  $K_{MG}$ .

#### *Sobre la reacción de esterificación catalizada por la enzima libre, Lipozyme CALB, en un medio con disolvente orgánico (Sistema 2)*

- 9) La conversión de equilibrio en el sistema abierto (A) es prácticamente 1, lo que confirma que el agua está siendo desplazada al evaporarse el tolueno (se forma un azeótropo de mínima entre ambas sustancias). Sin embargo, en el sistema cerrado (B), la conversión de equilibrio varía entre 0,6 y 0,8 según la temperatura pasa de 50 a 80 °C, al acumularse el agua en el medio de reacción.
- 10) Se ha establecido un modelo cinético que se ajusta a todos los datos experimentales. Entre los modelos propuestos, el que mejor resultados proporciona para el sistema A es un modelo hiperbólico de una reacción irreversible de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno, siendo representado por la ecuación [7.5], donde se incluyen los valores de los parámetros y sus intervalos de confianza. Mientras que para el sistema B, el modelo corresponde a un mecanismo simple de Michaelis-Menten para una reacción reversible (esterificación e hidrólisis), de pseudo-cero orden

respecto a las concentraciones de glicerina y agua, dado por la ecuación [7.6], de nuevo con el valor de los parámetros cinéticos y de sus intervalos de confianza.

**Sistema A (sistema abierto)**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.5]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 15,62 \pm 0,43 - \frac{6991 \pm 143}{T} \right]$$

$$K_{MG} = 1,22 \pm 0,25$$

**Sistema B (sistema cerrado)**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.6]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 11,42 \pm 0,44 - \frac{5274 \pm 148}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 2,30 \pm 0,75 - \frac{2468 \pm 255}{T} \right]$$

$$K_I = 0,86 \pm 0,29 \quad K_{MG} = 16,92 \pm 1,26$$

***Sobre la reacción de esterificación catalizada por la enzima inmovilizada, Novozym 435, en un medio libre de disolvente (Sistema 3)***

- 11) Se ha determinado el efecto de la transferencia de materia externa, en dos sistemas, uno sin añadir agua (sistema anhidro) y otro con una concentración de agua del 16,7% v/v (sistema con agua). Para un valor de la velocidad de agitación de 600-840 rpm, no hay cambios significativos en la velocidad inicial de esterificación ni para el sistema anhidro ni para el sistema con agua. Para estas condiciones fluido-dinámicas, la resistencia al transporte externo es despreciable, lo que se confirma aplicando el criterio de Mears ( $Me < 0,15$ ).
- 12) El estudio de la transferencia de materia en los poros del soporte pone de manifiesto un comportamiento solo ligeramente distinto en el sistema anhidro y en el sistema con agua. Los experimentos se han realizado utilizando distintas fracciones de tamaño de partícula del biocatalizador Novozym 435.



- a. Se evidenció la existencia de significativa resistencia al transporte en el interior de la partícula sólida. Se determinó el factor de efectividad ( $\eta$ ) los valores para el sistema anhidro y el sistema con agua son muy similares varían entre 0,08 y 0,16 para las fracciones de tamaño de partículas estudiadas, indicio de que el potencial catalizador de la enzima inmovilizada no se está aprovechando a plenitud.
  - b. El hecho de agregar una cierta concentración de agua en el medio de reacción no conlleva a cambios significativos en los valores del factor de efectividad.
  - c. La aplicación del criterio de Weisz-Prater ratificó la importancia de la transferencia de materia en los poros de la Novozym 435 en ambos sistemas (sistema anhidro y sistema con agua).
- 13) El ibuprofeno actúa como agente desactivante siendo más evidente la desactivación cuanto mayor es la temperatura. Por tanto, la desactivación enzimática es debida a la acción sinérgica de la concentración inicial de ibuprofeno (ácido) y de la temperatura.
- 14) El modelo cinético elegido para describir el sistema anhidro (sin agua) sugiere un modelo sigmoideal para una reacción reversible, de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y orden 2 con respecto a la concentración de monoéster, que tiene en cuenta una desactivación enzimática total de orden 1 respecto al ibuprofeno, que viene dado por las ecuaciones [7.7] a [7.9], donde se incluyen el valor de los parámetros y sus intervalos de confianza.

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_{IR}} \quad [7.7]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 15,14 \pm 0,44 - \frac{7800 \pm 148}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 19,58 \pm 2,35 - \frac{9562 \pm 794}{T} \right]$$

$$K_I = 11,14 \pm 0,58$$

$$S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG} \quad ; \quad k'_s = \exp \left[ 31,3 \pm 2,45 + \frac{10610 \pm 812}{T} \right] \quad [7.8]$$

$$-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I \quad ; \quad k'_d = \exp \left[ 89,13 \pm 1,97 - \frac{32408 \pm 690}{T} \right] \quad [7.9]$$

- 15) El modelo cinético propuesto para el sistema con adición de agua es un modelo similar al anterior: un modelo sigmoideal para una reacción reversible, de pseudo-

primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y concentración de monoéster con desactivación, siendo representado en las ecuaciones [7.10] a [7.12].

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_{IR}} \quad [7.10]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 17,92 \pm 0,25 \right] - \frac{8860 \pm 84}{T}$$

$$k'_2 = \exp \left[ 38,70 \pm 9,64 \right] - \frac{16830 \pm 3328}{T}$$

$$K_I = 3,84 \pm 0,13$$

$$S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG} \quad ; \quad k'_s = \exp \left[ (59,08 \pm 0,96) + \frac{1295 \pm 818}{T} \right] \quad [7.11]$$

$$-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I \quad ; \quad k'_d = \exp \left[ -1,27 \pm 0,51 - \frac{21927 \pm 340}{T} \right] \quad [7.12]$$

***Sobre la reacción de esterificación catalizada por la enzima inmovilizada, Novozym 435, en un medio con disolvente orgánico (Sistema 4)***

- 16) Al igual que en el caso anterior, en el estudio de la transferencia de materia en la interfase en ambos sistemas, anhidro y con agua, se pudo determinar que a velocidades por encima de 600 rpm la velocidad inicial de esterificación no presenta cambios significativos; lo que también quedó ratificado por la aplicación del criterio de Mears.
- 17) La transferencia de materia dentro de los poros del biocatalizador Novozym 435 resultan ser también importantes en los sistemas considerados (sistema anhidro y sistema con agua). Esto se ha podido comprobar con una experimentación similar a la descrita para el Sistema 3. Los valores del factor de efectividad ponen de manifiesto la existencia de limitaciones por difusión interna, ya que se obtienen valores menores de la unidad.
  - a. Para el sistema anhidro, dichos valores del factor de efectividad se encuentran entre 0,12 y 0,25.
  - b. Sin embargo, para el sistema con agua son mayores, ya que varían entre 0,32 y 0,66. El hecho de agregar una concentración de 7,4 %v/v de agua supone un aumento en la velocidad inicial de esterificación, y también de la velocidad de difusión, por lo que los valores del factor de efectividad son mayores con respecto al sistema anhidro.

- c. El criterio de Weisz-Prater confirma la existencia de limitaciones a la transferencia de materia interna significativas en ambos sistemas.
- 18) La presencia un cosolvente (tolueno) aumenta la velocidad de esterificación con respecto al sistema que no utiliza el cosolvente. Esto se puede deber a un aumento de la solubilidad del ibuprofeno, con un aumento de la velocidad de la reacción enzimática y, además, una mejora en la transferencia del sustrato hacia el centro activo de la enzima.
- 19) La desactivación por la sinergia concentración de ácido-temperatura cambia según la concentración de agua:
- En el sistema anhidro con tolueno, a tiempos largos de reacción (1500 min), a la máxima temperatura de 80 °C y la mayor concentración inicial de ibuprofeno estudiada (100 g·L<sup>-1</sup>), es evidente una desactivación de la enzima debida a la sinergia entre la concentración del ibuprofeno y la temperatura.
  - La adición de una concentración de agua de agua del 7,4 %v/v al medio de reacción, incrementa la producción del monoéster de ibuprofeno y evita la desactivación de la enzima.
- 20) El modelo cinético para este sistema, con la enzima inmovilizada y el empleo de un disolvente (tolueno) para el sistema anhidro que mejor se ajusta a los datos experimentales es un modelo hiperbólico para una reacción reversible, de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y de orden 2 con respecto a la concentración de monoéster, teniendo en cuenta una desactivación enzimática total de orden 1 respecto a la concentración de ibuprofeno, siendo representado por las ecuaciones [7.13] y [7.14], donde se incluyen los valores de los parámetros y de sus intervalos de confianza.

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.13]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 4,57 \pm 0,28 - \frac{3888 \pm 93}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ -3,94 \pm 1,91 - \frac{1296 \pm 637}{T} \right]$$

$$K_I = (9,90 \pm 0,89) \quad K_{MG} = 44,36 \pm 3,90$$

$$-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I ; \quad k'_d = \exp \left[ 72,86 \pm 7,90 - \frac{27207 \pm 2795}{T} \right] \quad [7.14]$$

- 21) El mejor modelo de los propuestos para el mismo sistema pero con adición de agua, es un modelo cinético diferente, que es hiperbólico, para una reacción reversible, de pseudo-primer orden con respecto a la concentración de ibuprofeno y la concentración de monoéster, y que no tiene en cuenta ningún tipo de desactivación; queda representado por la ecuación [7.15].

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.15]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 6,69 \pm 0,38 - \frac{4766 \pm 129}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ -5,00 \pm 1,73 - \frac{1689 \pm 583}{T} \right]$$

$$K_I = 1,55 \pm 0,31 \quad K_{MG} = 14,70 \pm 0,98$$

### 7.3. - SUMMARY and CONCLUSIONS

The scarcity and depletion of traditional fossil energy sources and their negative influence in the environment, especially in the change climate, is the main reason behind many efforts in technological and scientific research and development in our days. As an international response to this concern, the Kyoto protocol, in 1997, established the policies and regulatory frameworks related to the use of renewable energies. Recently, the 2015 United Nations Climate Change Conference in Paris has being held at the same time as this thesis is written, aiming at a full international commitment to avoid an increase in the global average temperature higher than 2 °C. This political impulse has boosted, and is boosting, the production of renewable energies, including biofuels, specifically biodiesel. Glycerol is produced as a by-product of biodiesel manufacturing process (approximately, a 10% weight based on the raw material). Owing to the saturation of the existing glycerol market, the price of this chemical has dropped in the last 15 years. Therefore, new uses of glycerol are looked for as glycerol is look upon as a new platform chemical.

Among synthesis reaction, esterification of glycerol is an interesting reaction to develop new processes for this chemical. Thus, glycerol esters (mono-di and tri glycerides), obtained by esterification of glycerol with carboxylic acid, are used as food additives, solvents, emulsifiers, antioxidants, and in many other applications. This reaction can be carried out thermally or by using homogeneous and heterogeneous conventional or enzymatic catalyst. On the other side, the use of lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) as biocatalysts is gaining significance due to their high activity, the lack of need for co-factors, their synthetic activity in organic solvents and, mainly, their wide range of substrate specificities and mild operating conditions.

The aim of this work is to study the esterification of glycerol with ibuprofen (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) using lipases as biocatalyst, specifically *Candida antarctica* lipase B in both free and immobilized industrial preparations, so thus, in solventless media or in an organic media. Ibuprofen monoester is a product with applications in the pharmaceutical industry. In this regard, NSAIDs ester (prodrugs) have been developed to block the carboxylic acid group of NSAIDs as a way of reducing or avoiding the gastrointestinal (GI) side effects caused by chronic use by oral administration. At the present time, prodrugs of NSAID have been used as suspensions,

emulsion, microemulsion and nanoemulsions, i.e. froben is a topical form of flurbiprofen marketed by Abbott, and there are new patents on transdermal hydrogels of dexibuprofen and transdermal ketoprofeno derivatives.

A working procedure has been established for running the trials in a reproducible way. Esterification runs were batch-wise performed in a temperature controlled agitated reactor. In addition, generated samples were analyzed using different techniques, depending on the proposal of the analysis: Esterification reaction samples were analyzed by reversed-phase chromatography in a JASCO HPLC modular system. The components were separated using a Mediterranean Sea-18 column (Teknokroma) at 35 °C and a mixture of methanol: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM (pH 2.2) in a volume ratio of 83:17 as eluent flowing at 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. Detection of ibuprofen and its esters was performed with a JASCO diode array detector (model MD 2010) at 254 nm. The compounds were quantified by using the area normalization method, taking into account that their UV-vis spectra are identical. Peak areas of compounds were used to determining their conversion. For the identification of the product, the HPLC-MS was used.

The solubility of ibuprofen in glycerol and toluene were determined by <sup>1</sup>H-NMR at 300 MHz after the identification of adequate signals of ibuprofen ( $\delta=0.85$  ppm), glycerol ( $\delta=4.1-4.4$  ppm) and toluene ( $\delta=0.85$  ppm). Heterogeneous catalyst Novozym 435 was characterized with its Nitrogen BET-isotherms and SEM microscopy. Finally, the characterization of suspension-emulsion formed when mixing ibuprofen and glycerol and further adding the enzyme solution was performed by using FBRM for the biggest particles and drops (1-1000  $\mu$ m) and UV-vis spectrophotometry at 600 nm and particle sizing using dynamic light scattering (DLS) for the smaller ones.

In the esterification of glycerol with ibuprofen catalyzed by CALB (free and immobilized) for obtaining ibuprofen monoester has been considered the following reaction systems:

- **System 1:** CALB in a free form in solventless media. The biphasic system (L-S), where L is the liquid phase that it is formed of glycerol and CALB, while S is the solid phase is formed by ibuprofen, which it is to be dissolved.
- **System 2:** CALB in a free form in organic media (toluene). This is a system (L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>), where L<sub>1</sub> is the liquid phase that it is formed of glycerol and CALB, while L<sub>2</sub> is the phase formed by ibuprofen dissolved in the cosolvent.

- **System 3:** CALB in an immobilized form in solventless media. This biphasic system (L-S), where L is formed by the ibuprofen dissolved in the glycerol, while the phase S is constituted by the CALB immobilized (Novozym 435). However, there may be other solid phase formed by the ibuprofen undissolved in the glycerol, which would be a three-phase system, at moderate reaction temperatures.
- **System 4:** Novozym 435 in organic media (toluene) is a three-phase system ( $L_1$ - $L_2$ -S), where the phase  $L_1$  is constituted of ibuprofen dissolved in toluene, the phase  $L_2$  is of glycerol and the phase S is constituted by immobilized enzyme.

In all these systems, reaching these objectives is sought:

1. To determine the effect of the variables that can affect the activity and stability of the biocatalyst in its free and immobilized form and, therefore, their effect on the esterification reaction of glycerol and ibuprofen.
2. To propose several kinetic models describe the experimental data obtained in each system, and to select the kinetic model that best fits the experimental data using physical and statistical criteria.

Therefore, in all systems, the effects of operational conditions as enzyme concentration, stirring speed, substrate and product inhibition and deactivation possible by temperature were determined. In Table 7.1 the operation conditions range are shown; they were studied in each one of systems considered. In addition, in System 2, the organic media was selected by determining the ibuprofen solubility in the following solvents: 2-butanol, 2-butanone, 1-4-dioxane, tert-butyl alcohol, tetradecane, toluene and xylene, selecting toluene as the solvent in the second liquid phase. Also, in System 4, toluene was used as organic media (solvent in liquid phase II). In the order hand, in Systems 3 and 4, the influence of the internal and external mass transfer diffusional limitations were studied (Table 7.2). Experimental results in external mass transfer were confirmed by using Mears criterion (Me). In the same way, in internal mass transfer and to verify the results obtained, the effectiveness factor ( $\eta$ ) values at several particle diameter values were determined by an equation systems (equation [7.16]), calculating the average value of effectiveness factor with the equation [7.17]. The absence or presence of mass transfer limitations was obtained by applying the Weisz-Prater (We-Pt) criterion.

$$\frac{\eta_i}{\eta_j} = \frac{r_{obs,i}}{r_{obs,j}} \quad i = 1, 2; j = 2, 3, 1 \quad [7.16]$$

$$\bar{\eta} = \sum_{i=1}^n x_i \cdot \eta_i \quad [7.17]$$

where:  $\eta_i$  are the values for each one particle size fraction,  $\bar{\eta}$  is the effectiveness factor of average fraction,  $x_i$  is the mass percentage of each one particle size fraction.

**Table 7.1.** Operational conditions and their experimental intervals for the systems considered in the esterification of glycerol with ibuprofen catalyzed by CALB L (Systems 1 to 4)

Variable	System 1	System 2	System 3	System 4
Enzyme	Free CALB	Free CALB	Novozym 435	Novozym 435
Media reaction	Solventless	Organic media	Solventless	Organic media
Enzyme concentration (g·L <sup>-1</sup> )	0.7 to 2.7	0.7 to 2.7	10 to 40	10 to 40
Stirring speed (rpm)	120-1200	120-960	120-840	120-840
Water concentrations (%v/v)	6 to 15	6 to 15	0 to 16.7	0 to 7.4
Initial concentration of ibuprofen (g·L <sup>-1</sup> )	20 to 100	20 to 100	20 to 100	20 to 100
Temperature (°C)	50 to 80	50 to 80	50 to 80	50 to 80
Ratio Gly-Tol (mL/mL)	-	1/20; 10/10 and 20/5	-	1/20; 10/10 and 20/5

**Table 7.2.** Operational conditions and their experimental intervals for the systems considered in the esterification of glycerol with ibuprofen catalyzed by Novozym 435 (Systems 3 and 4)

	Variable	System 3	System 4
External Mass Transfer	Enzyme concentration (g·L <sup>-1</sup> )	30	30
	Stirring speed (rpm)	120-840	120-840
	Water concentrations (%v/v)	0 and 16.7	0 and 7.4
	Initial concentration of ibuprofen (g·L <sup>-1</sup> )	100	100
	Temperature (°C)	50 to 70	50 to 70
	Ratio Gly-Tol (mL/mL)	-	20/5
Internal Mass Transfer	Particle size of biocatalyst (mm)	d <sub>p1</sub> = 0.32-0.5 d <sub>p2</sub> = 0.5-0.7 d <sub>p3</sub> = 0.7-1 d <sub>p4</sub> = 0.3- 1	d <sub>p1</sub> = 0.32-0.5 d <sub>p2</sub> = 0.5-0.7 d <sub>p3</sub> = 0.7-1 d <sub>p4</sub> = 0.3- 1
	Enzyme concentration (g·L <sup>-1</sup> )	30	30
	Stirring speed (rpm)	120-840	120-840
	Water concentrations (%v/v)	0 and 16.7	0 and 7.4
	Initial concentration of ibuprofen (g·L <sup>-1</sup> )	100	100
	Temperature (°C)	50 to 70	50 to 70
	Ratio Gly-Tol (mL/mL)	-	20/5



According to results in the preliminary experiments, experimental conditions for kinetic studies in each one of system considered were set. They are:

- **System 1:** Enzyme concentration  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , stirring speed 720 rpm, water concentration 6 and 10 % v/v, initial concentration of ibuprofen 20 to  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , temperature 50 to  $80^\circ\text{C}$ .
- **System 2:** Enzyme concentration  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , stirring speed 720 rpm, water concentration 6 %v/v, initial concentration of ibuprofen 20 to  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , temperature 50 to  $80^\circ\text{C}$  and ratio Gly-Tol 20/5.
- **System 3:** Enzyme concentration  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , stirring speed 720 rpm, water concentration 0 and 16.7% v/v, initial concentration of ibuprofen 20 to  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , temperature 50 to  $80^\circ\text{C}$ .
- **System 4:** Enzyme concentration  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , stirring speed 720 rpm, water concentration 0 and 7.4 % v/v, initial concentration of ibuprofen 20 to  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , temperature 50 to  $80^\circ\text{C}$  and Gly-Tol 20/5.

Using experimental data collected in the esterification runs under the interval aforementioned in each one system, the adequate kinetic model is selected among a proposed set of these models; proposed kinetic models are developed base on the Ping-pong Bi-Bi mechanism, generally accepted for lipase catalyzed esterification reactions. These kinetic models were fitted step-by-step to data at a given temperature and at all temperatures at the same time, in a second fitting protocol, using numerical integration of the differential equations of the models using a 4<sup>th</sup> order Runge-Kutta algorithm coupled to nonlinear regression fitting by a Marquardt-Levenberg algorithm. Subroutines for both algorithms are included in Aspen Custom Modeler v7.3. Comparison of models and final selection of the most appropriate one were made applying physical and statistical criteria. Adequate values for activation energies are outstanding physical criteria for model selection. Statistical considerations include narrow error intervals of the model constants computed and reasonable values of the information and goodness-of-fit criteria. Regarding statistical criteria, several parameters related to the amount of experimental data, the number of kinetic parameters and the total sum of residuals are considered for the selection of the most adequate model, which give precise account of the goodness of fit and over-parameterization. These parameters are: the square root of the mean square

error (RMSE), Fischer's F-value, Akaike information criteria (AICc), bayesian information criterion (BIC) and the percentage of variation (% VE).

Therefore, the experimental work and the analysis and interpretation of the results lead to the following conclusions regarding the esterification of glycerol with ibuprofen catalyzed by CALB (free and immobilized form):

***On the experimental methods***

- 1) Experimental methods were established, including several experimental procedures and analysis techniques, which have provided reliable and reproducible experimental data.
  - a. RP-HPLC analysis is able to quantitatively analyze the possible products of reaction, easily and quickly. The remarkable selectivity of lipase towards the ibuprofen monoester by applying HPLC-MS was confirmed.
  - b. Solubility of ibuprofen in glycerol and toluene, as well as partition of this compound between both solvents, was determined by  $^1\text{H}$  RMN.
  - c. Analysis techniques by FBRM, UV-vis spectrophotometry and DLS allowed characterizing the suspension-emulsion in each case.
- 2) The number of drops in the suspension-emulsion formed when mixing ibuprofen-glycerol and further adding the free enzyme CALB, at several temperatures, was followed by FBRM. It was determined that the number of drops and their mean size at higher conversion (time) and temperature varied with time and temperature, being almost impossible to detect them at 80 °C. The DLS technique was used with drops in the nanometer range (0-200 nm) and to monitorize the evolution of their size with the progression of the reaction at several temperatures.

***On the solubility and miscibility of different phases***

- 3) The solubility of ibuprofen in glycerol and toluene and its partition between both solvents presents these features:
  - a. The solubility of ibuprofen is very poor in glycerol at low temperature, but increases exponentially with it.
  - b. Among the solvents studied, high solubility of ibuprofen was obtained in toluene, so this solvent was selected as the apolar organic reaction solvent. This solubility increases significantly with temperature increment.

- c. The partition ratio of ibuprofen ( $K_p$ ) between the toluene and the glycerol decreases while temperature rises from 50 to 80 °C. In this interval, it has found that ibuprofen concentration is higher in toluene than in glycerol.
- 4) Considering the capacities as emulsifier and solvent of ibuprofen monoester (monoglyceride): a temperature value near or above the melting point of ibuprofen, plays an important role in the suspension-emulsion nature, increasing the solubility of ibuprofen and dispersion of this compound in glycerol. In fact, it was observed by FBRM and DLS a bimodal distribution of droplets of ibuprofen in glycerol that depends on temperature and the reaction time. In addition, this conclusion is confirmed by observing the increase in the turbidity analyzed by UV-vis spectrophotometry. The increase in the dispersion of ibuprofen in the glycerol turns the suspension in an emulsion with a clearer, translucent aspect. This change happens at 70 and 80 °C, at high values of conversion and, as a result, at high monoglyceride concentrations.
- 5) The presence of low or high water concentration in the reaction media, within of the range studied (6 a 16.7 %v/v) has different effects, according to the system considered:
  - a. In System 1 (glycerol + ibuprofen + free enzyme CALB), the addition of water produces an increment in the initial rate of esterification and the final yield to ibuprofen monoester. The addition of water at zero time decreases the viscosity of the glycerol phase, improving the contact between the liquid phases. On the other side, the high affinity of glycerol for water could get her away from the active site, shifting equilibria towards the products and increasing the final conversion.
  - b. However, in the case of System 2 (glycerol + ibuprofen + free enzyme CALB + toluene as cosolvent), addition of water produces a decrease in the initial rate of esterification and the final yield to ibuprofen monoester, suggesting the accumulation of water in the vicinity of the enzyme under these conditions.
  - c. The influence of the addition of water in System 3 (glycerol + ibuprofen + immobilized enzyme CALB) and in the System 4 (glycerol + ibuprofen + free enzyme CALB + toluene) was determined with the decrease of the viscosity of the mixture, which promote the internal and external mass

transfer, and also it has an action on the reaction rate, but this phenomena is always associated to mass transport within the pores of the solid support of the solid enzyme catalyst.

***On the esterification reaction catalyzed by free enzyme, Lipozyme CALB L, in solventless media (System 1)***

- 6) In these conditions, the esterification reaction can be considered reversible, although with high equilibrium conversion. Such conversion varied with the addition of water, between 6 to 10 %v/v, for an initial concentration of ibuprofen at 20 to 100 g·L<sup>-1</sup>, temperature range at 50 to 80 °C and enzyme concentration at 2 g·L<sup>-1</sup>; the conversion values of ibuprofen monoester achieved varied from 92 to 98%. The system is open to the atmosphere, so partial water evaporation can be expected, as suggested by several works in biocatalysis literature.
- 7) The kinetic model selected was a reversible simple michaelis-menten model that involves both esterification and hydrolysis, being of pseudo-zero order for glycerol and water concentration. The kinetic equations featuring the parameters and their error are the following:

**Kinetic model with 6 % v/v of water**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.18]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 6.71 \pm 2.25 - \frac{4612 \pm 110}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 10.40 \pm 0.33 - \frac{4305 \pm 767}{T} \right]$$

$$K_I = 5.82 \pm 0.57 \quad K_{MG} = 23.03 \pm 1,6$$

**Kinetic model with 10 % v/v of water**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.19]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 15.37 \pm 0.49 - \frac{5891 \pm 151}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 21.79 \pm 4.91 - \frac{9036 \pm 1710}{T} \right]$$

$$K_I = 30.15 \pm 5.81 \quad K_{MG} = 41.51 \pm 8.3$$

- 8) Activation energies values are different for 6 and 10%v/v of water concentration: the value of this parameter for the direct reaction constant  $k_1$  increases from 37  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  to 48  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , while in the case of the reverse reaction constant  $k_2$ , it changes from 35  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  to 74  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . The presence of a high water concentration (10 %v/v) increases the control of the chemical reaction rate on the overall rate. This fact is also reflected on the changes underwent by the values of the constants in the denominator of the kinetic equation,  $K_I$  and  $K_{MG}$ .

***On the esterification reaction catalyzed by free enzyme, Lipozyme CALB L, in a double phase organic system (System 2)***

- 9) In System A, an open system, the equilibrium conversion is practically 1, indicating water removal during the process (a minimum boiling point azeotrope is formed between water and toluene, aiding for water removal). However, in the closed system (B), final equilibrium conversion varied between 0.6 and 0.8 as the temperature changes from 50 to 80 °C; water accumulates in the reaction media.
- 10) A kinetic model to fit all experimental data has been established. Among the proposed models, for the System A, the best model is a hyperbolic model of irreversible reaction of pseudo-first order with respect of the ibuprofen concentration, presented by the equation [7.20], featuring parameters values and errors. While, for the system B, a simple reversible Michaelis-Menten model (esterification and hydrolysis), with pseudo-zero order respect to glycerol and water concentrations, was selected. This model is given by equation [7.21], which includes parameters values, with their error intervals at 95% confidence.

**System A (open system)**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I}{1 + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.20]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 15.62 \pm 0.43 - \frac{6991 \pm 143}{T} \right]$$

$$K_{MG} = 1.22 \pm 0.25$$

**System B (closed system)**

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.21]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 11.42 \pm 0.44 - \frac{5274 \pm 148}{T} \right]$$

$$k_2' = \exp \left[ 2.30 \pm 0.75 - \frac{2468 \pm 255}{T} \right]$$

$$K_I = 0.86 \pm 0.29 \quad K_{MG} = 16.92 \pm 1.26$$

***On the esterification reaction catalyzed by immobilized enzyme, Novozym 435, in solventless media (System 3)***

- 11) The effect of the external mass transfer was determined, in two systems, one without water (so-called “anhydrous system”) and another with a water concentration of 16.7 %v/v (system with water). For a stirring speed at 600-840 rpm, for both systems there are not significant changes in the initial rate of esterification. In these fluid dynamical conditions, resistance of external mass transport can be neglected, aspect confirmed by Mears criterion ( $Me < 0.15$ ).
- 12) In the study of mass transfer limitation in the pores of support, the experiments were performed by using several particle size fraction of the Novozym 435 biocatalyst.
  - a. The existence of significant resistance transport inside of solid particle has been evidenced. The effectiveness factor ( $\eta$ ) was determined, the values in the anhydrous system and the system with water are very similar, varying among 0.08 and 0.16 for the particle size interval studied, indicating that the catalyst potential is not totally employed.
  - b. To add a certain amount water concentration in the reaction media does not result in significant changes in the effectiveness factor value.
  - c. The application of the Weisz-Prater criterion confirmed the importance of mass transfer within of the pores of Novozym 435 in both systems (with or without added water at zero reaction time).
- 13) Ibuprofen acts as a deactivating agent, being the deactivation more evident when the temperature is increased. Therefore, enzyme deactivation is due to a synergic action of ibuprofen (acid) and temperature.
- 14) The kinetic model chosen for the anhydrous system (without added water) suggested a reversible sigmoidal model with pseudo-first order with respect to ibuprofen and order 2 with respect to monoester ibuprofen, adding a total deactivation of the enzyme, with partial first order for ibuprofen and enzyme residual activity, as given for the equations [7.22] a [7.24]:

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_{IR}} \quad [7.22]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 15.14 \pm 0.44 - \frac{7800 \pm 148}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 19.58 \pm 2.35 - \frac{9562 \pm 794}{T} \right]$$

$$K_I = 11.14 \pm 0.58$$

$$S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG} ; k'_s = \exp \left[ 31.3 \pm 2.45 + \frac{10610 \pm 812}{T} \right] \quad [7.23]$$

$$-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I ; k'_d = \exp \left[ 89.13 \pm 1.97 - \frac{32408 \pm 690}{T} \right] \quad [7.24]$$

15) In the system with added water, the proposed kinetic model is very similar to the aforementioned model: A reversible sigmoidal model, pseudo- first order for the ibuprofen and monoester with a similar deactivation sub-model. The final model is presented in the equations [7.25] a [7.27]:

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{IR} - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_{IR}} \quad [7.25]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 17.92 \pm 0.25 - \frac{8860 \pm 84}{T} \right]$$

$$k'_2 = \exp \left[ 38.70 \pm 9.64 - \frac{16830 \pm 3328}{T} \right]$$

$$K_I = 3.84 \pm 0.13$$

$$S_{IR} = C_{IR0} + k_s \cdot C_{MG} ; k'_s = \exp \left[ (59.08 \pm 0.96) + \frac{1295 \pm 818}{T} \right] \quad [7.26]$$

$$-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I ; k'_d = \exp \left[ -1.27 \pm 0.51 - \frac{21927 \pm 340}{T} \right] \quad [7.27]$$

***On the esterification reaction catalyzed by immobilized enzyme, Novozym 435, in organic media (System4)***

16) As in the previous case, in the study of the mass transfer in the interface of both systems, anhydrous and with water, it can be determined that the initial rate of esterification has not significant change over a stirring speed at 600 rpm; this observation was confirmed by using the Mears criterion.

17) The mass transfer within of pores of the Novozym 435 resulted important in the systems considered (anhydrous system and system with water), by performing an experimental study similar to the one for System 3. The effectiveness factor

values indicated the existence of internal diffusional limitations, as the values for this parameter were lower than unity.

- a. In the anhydrous system, such effectiveness factor values are among 0.12 and 0.25.
  - b. However, for the system with water, effectiveness factor is higher, varying between 0.32 y 0.66.
  - c. In fact, to add water till an initial concentration of 7.4 %v/v supposed an increase in the initial reaction and in the diffusion rates. Therefore, the effectiveness factor values are higher than the anhydrous system.
  - d. The Weiz-Prater criterion validated the existence of significant internal mass transfer limitations in both systems.
- 18)** The presence of a cosolvent (toluene) increased the esterification rate in comparison with the system using glycerol both as solvent and reagent. This can be due to an increase in ibuprofen solubility, which leads to a higher mass transfer rate within the pores and a higher average reaction rate.
- 19)** Deactivation by the synergy acid – temperature action changes according to water concentrations:
- a. In the anhydrous system with toluene, at high reaction time (1500 min), at the maximum temperature of 80 °C, and the highest initial concentration of ibuprofen (100 g·L<sup>-1</sup>), an enzyme deactivation due to the synergy among the ibuprofen concentration and the temperature is evident.
  - b. The addition of water concentration till a final 7.4 %v/v with respect to the reaction media increases the ibuprofen monoester production and reduces or avoids enzyme deactivation.
- 20)** For this system, with no added water and using immobilized enzyme and a second solvent (toluene), the model that fits best to experimental data is a reversible hyperbolic model with pseudo-first order for the ibuprofen concentration and second order for the monoester concentration, taking into account a total enzymatic deactivation with first order with respect to ibuprofen. The kinetic equations [7.28] y [7.29] contains the parameter and their error.

$$r = \frac{k'_1 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_I - k'_2 \cdot C_{E0} \cdot a_R \cdot C_{MG}^2}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.28]$$

$$k'_1 = \exp \left[ 4.57 \pm 0.28 - \frac{3888 \pm 93}{T} \right]$$



$$k_2' = \exp \left[ -3.94 \pm 1.91 - \frac{1296 \pm 637}{T} \right]$$

$$K_I = (9.90 \pm 0.89) \quad K_{MG} = 44.36 \pm 3.90$$

$$-\frac{da_R}{dt} = k_d \cdot a_R \cdot C_I ; \quad k_d' = \exp \left[ 72.86 \pm 7.90 - \frac{27207 \pm 2795}{T} \right] \quad [7.29]$$

**21)** The best proposed model for this System 4 with water is a kinetic model different to the one for the system without water. In this case, it is a hyperbolic reversible kinetic model with partial pseudo-first order with respect to ibuprofen and monoester concentration, and without deactivation. The model is represented by the equation [7.30].

$$r = \frac{k_1' \cdot C_{E0} \cdot C_I - k_2' \cdot C_{E0} \cdot C_{MG}}{1 + K_I \cdot C_I + K_{MG} \cdot C_{MG}} \quad [7.30]$$

$$k_1' = \exp \left[ 6.69 \pm 0.38 - \frac{4766 \pm 129}{T} \right]$$

$$k_2' = \exp \left[ -5.00 \pm 1.73 - \frac{1689 \pm 583}{T} \right]$$

$$K_I = 1.55 \pm 0.31 \quad K_{MG} = 14.70 \pm 0.98$$

---

***Capítulo 8***  
**NOMENCLATURA**

---

## 8.- NOMENCLATURA

a	Área de transferencia de materia ( $\text{m}^2$ )
Abs	Absorbancia (nm)
$A_M$	Sección transversal ocupada por cada molécula de adsorbato ( $\text{nm}^2$ )
$a_R$	Actividad enzimática remanente (-)
C	Concentración del compuesto i ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ó ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$D_e$	Coefficiente de difusión efectivo ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
$D_{ij}$	Difusividad molecular del compuesto i en el compuesto j ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
$d_p$	Diámetro medio de partícula del soporte de la enzima (mm)
$d_{\text{poro}}$	Diámetro medio del poro del soporte de la enzima (nm)
$E_{a,k}$	Energía de activación de constante cinética ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
$F_T$	Par Torsión del viscosímetro ( $\text{N}\cdot\text{m}$ )
$k_d$	Constante cinética de desactivación de la enzima ( $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )
$K_i$	Constante de adsorción del compuesto i ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$k_i$	Constantes cinéticas del compuesto i ( $\text{min}^{-1}$ ) o ( $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )
$k_{i,0}$	Factor pre-exponencial de constante cinética ( $\text{min}^{-1}$ ) o ( $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )
$k_L$	Coefficiente de transferencia de materia ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$K_p$	Relación de partición de ibuprofeno en tolueno y glicerina ( $([\text{mol I}]/[\text{mL Tol}])_1 / ([\text{mol I}]/[\text{mL Gli}])_2$ )
$k_s$	Constante empleada para describir la solubilidad de ibuprofeno en el medio de reacción, ec. [5.13] (-)
L	Longitud de celda de viscosímetro (cm)
Log P	Coefficiente de partición octanol/agua (-)
Me	Módulo de Mears (-)
$M_V$	Volumen molecular (mL)
n	Orden de reacción (-)
N	Velocidad de agitación (rpm)
$N_A$	Número de Avogadro (átomos/mol)
$n_i$	Moles de compuesto i (mol)
$P_s$	Presión de saturación (bar)
$P_0$	Presión (bar)
R	Constante de los gases ideales ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
$r_{\text{obs}}$	Velocidad observada de desaparición del reactivo ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )
ro	Velocidad inicial de reacción de esterificación ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )

$R_K$	Radio Kelvin (cm)
$R_v$	Radio de celda del viscosímetro (cm)
$R_p$	Radio de poro (nm)
$S$	Solubilidad del ibuprofeno en glicerina (g I/ g Ste)
$S_{BET}$	Área superficial BET ( $m^2 \cdot g^{-1}$ )
$S_{IR}$	Solubilidad del ibuprofeno en el medio de reacción ( $mol \cdot L^{-1}$ )
$Ste$	Disolvente (-)
$T$	Temperatura ( $^{\circ}C$ )
$t$	Tiempo ( $min^{-1}$ )
$T_{N_2}$	Temperatura de ebullición de nitrógeno (K)
$X$	Conversión
$x_i$	Porcentaje de masa de cada una de las distintos tamaños de partículas (%w/w)
$V_A$	Volumen adsorbido (mL)
$V_M$	Volumen molar de nitrógeno ( $cm^3 \cdot mol^{-1}$ )
$V_m$	Volumen monocapa (mL)
$We-Pt$	Módulo de Weisz-Prater (m)
$Y_i$	Rendimiento final

### Letras griegas

$\gamma$	Tensión superficial de adsorbato a temperatura igual a T ( $mN \cdot m^{-1}$ )
$\gamma_c$	Espesor de la película de nitrógeno adsorbido (cm)
$\gamma_v$	Velocidad de deformación ( $s^{-1}$ )
$\delta$	Desplazamiento en resonancia magnética (ppm)
$\delta_v$	Espesor de celda de viscosímetro (mm)
$\varepsilon_p$	Porosidad del sólido con la enzima inmovilizada (-)
$\eta$	Factor de efectividad (-)
$\mu$	Viscosidad de disolvente ( $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ )
$\mu_m$	Viscosidad de mezcla ( $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ )
$\rho$	Densidad ( $kg \cdot L^{-1}$ )
$\sigma$	Factor de constricción (-)
$\tau$	Tortuosidad (-)
$\tau_v$	Tensión tangencial ( $N \cdot m^{-2}$ )
$\omega$	Velocidad angular ( $rad \cdot s^{-1}$ )

### **Subíndices**

0	Condición inicial
1	Constante cinética directa
2	Constante cinética inversa
i	Relativo al componente i
E	Enzima
Eq	Equilibrio
Gli	Glicerina
I	Ibuprofeno
MG	Monoéster de ibuprofeno
Tol	Tolueno
Tot	Total o final
w	Agua

### **Técnicas de análisis**

DLS	Dispersión de luz dinámica
FBRM	Medida por reflexión del rayo enfocado
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<sup>1</sup> H RMN	Resonancia magnética de protón
SEM	Microscopía electrónica de barrido

### **Criterios estadísticos**

AICc	Criterio de información de Akaike
BIC	Criterio de información bayesiano
F	F de Fisher
K	Número de parámetros
N <sub>dexp</sub>	Número de datos experimentales
RMSE	Error residual medio al cuadrado
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SQR	Sumatoria de los residuos al cuadrado
VE	Porcentaje de variación explicativa (%)